

Die Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-4 im humanen Neuroblastom

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Victoria Sophie Hoene

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h. c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
 2. Prof. Dr. Christof Dame
 3. PD Dr. Alexander Schramm

Tag der mündlichen Prüfung: 7. September 2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 GATA-Transkriptionsfaktoren	3
1.1.1 GATA-4	5
1.1.1.1 Die Regulation von GATA-4	6
1.1.1.2 Posttranslationale Modifikationen von GATA-4	7
1.1.1.3 GATA-4 in Tumoren.....	9
1.1.2 FOG-2	10
1.2 Das Neuroblastom	12
1.2.1 Die Entstehung des Neuroblastoms	12
1.2.2 Prognostische Faktoren für die Risikoabschätzung beim Neuroblastom	14
1.2.3 Therapie des Neuroblastoms.....	18
1.2.3.1 Retinsäure	18
1.2.4 Neuroblastom-Zelllinien.....	19
1.3 Zielstellung	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Computerprogramme	23
2.1.3 Chemikalien	23
2.1.4 Enzyme	25
2.1.5 Antikörper.....	26
2.1.6 DNA- und Protein-Marker	28
2.1.7 Primer.....	28
2.1.8 Bakterien, Zelllinien, humanes Tumor-Gewebe und Tiere	31
2.1.8.1 Bakterien.....	31
2.1.8.2 Zelllinien.....	31

2.1.8.3	Humanes Neuroblastom-Gewebe	33
2.1.8.4	Tiere	34
2.1.9	Sonstige Materialien	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1.1	Extraktion von RNA und Quantifizierung	35
2.2.1.2	Reverse Transkription	35
2.2.1.3	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.1.4	Real-time Polymerase-Kettenreaktion	37
2.2.1.5	Klonierung lentiviraler Vektoren	38
2.2.1.6	Northern Blot	41
2.2.2	Zellbiologische Methoden	42
2.2.2.1	Zellkultur	42
2.2.2.2	Kryopreservation und Auftauen von Zellen	43
2.2.2.3	Zellzahlbestimmung	43
2.2.2.4	Lentivirenproduktion	45
2.2.2.5	Lentivirale Transduktion	45
2.2.2.6	Behandlung der Zellen mit all- <i>trans</i> Retinsäure	46
2.2.3	Biochemische Methoden	47
2.2.3.1	Proteinextraktion und -quantifizierung	47
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.2.3.3	Western Blot	48
2.2.4	Histochemische und histologische Methoden	49
2.2.4.1	Immunhistochemie	49
2.2.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	51
2.2.4.3	Bildaufnahme und Bildbearbeitung	51
2.2.5	Expressionsanalyse mittels Microarray	51
2.2.6	Chromatin-Immunpräzipitations-Assay	52
2.2.7	Statistische Analysen	53

3	ERGEBNISSE	54
3.1	Expressionsanalysen von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 im humanen Neuroblastom im Vergleich zum sich entwickelnden Nervensystem der Maus	54
3.1.1	Die Expression von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 im humanen Neuroblastom	54
3.1.2	Die Expression von Gata-4 und Fog-2 im sich entwickelnden Nervensystem der Maus	55
3.1.3	Unterschiedliche Expressionsstärken von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 in verschiedenen Neuroblastom-Subtypen	60
3.2	Einfluss von GATA-4 (+/- FOG-2) auf die Proliferation und Morphologie von Neuroblastomzellen	67
3.2.1	Vergleich der Expression von GATA-4 und FOG-2 in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien	67
3.2.2	Überexpression von GATA-4 und FOG-2 in SH-SY5Y und SH-EP mittels Lentiviren	68
3.2.3	Einfluss von GATA-4 und FOG-2 auf die Proliferation von Neuroblastomzellen	71
3.2.4	Einfluss von GATA-4 auf die Morphologie von Neuroblastomzellen	73
3.3	Identifikation von Zielgenen von GATA-4 im Neuroblastom	74
3.3.1	Microarray-Analyse GATA-4 überexprimierender SH-SY5Y Zellen	74
3.3.2	Auswahl von <i>DPYSL3</i> als potentiell Zielgen	76
3.3.3	<i>Bcl-2</i> als potentiell Zielgen von GATA-4	77
3.4	Einfluss von Retinsäure auf GATA-Faktoren in Neuroblastomzellen	79
4	DISKUSSION	82
4.1	GATA-2, -3, -4 und FOG-2 im Neuroblastom	82
4.2	Gata-4 und Fog-2 im sich entwickelnden Nervensystem	83
4.3	Expressionsanalysen in verschiedenen Subtypen des Neuroblastoms	86
4.4	Die Rolle von GATA-4 im Neuroblastom	92
4.5	<i>DPYSL3</i> als potentiell Zielgen von GATA-4 im Neuroblastom	96
4.6	Einfluss von Retinsäure auf GATA-Faktoren im Neuroblastom	97
4.7	Schlussfolgerung	101
4.8	Ausblick	102

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	103
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	106
PUBLIKATIONEN	125
DANKSAGUNG	127
LEBENS LAUF	129
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	130

Zusammenfassung

GATA-Transkriptionsfaktoren, bei Vertebraten eine Gruppe von sechs Zinkfinger-Proteinen, spielen bei der Zellproliferation und -differenzierung während der normalen Entwicklung vieler Organe eine wesentliche Rolle. Ihre Deregulation ist jedoch auch mit Erkrankungen in Verbindung gebracht worden, u. a. mit malignen Tumoren. Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, der von den sympathischen Vorläuferzellen des autonomen Nervensystems ausgeht. Er ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter und stellt durch seine außerordentliche biologische und klinische Heterogenität eine große Herausforderung dar. Ziel dieser Arbeit war es, die GATA-Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3, -4 und den Kofaktor *friend-of-GATA* (FOG)-2 hinsichtlich ihrer Expression im Neuroblastom und im sich entwickelnden sympathischen Nervensystem zu vergleichen. Davon ausgehend galt es, die Rolle der Proteine im Neuroblastom zu charakterisieren.

Es wurde gezeigt, dass alle vier Proteine in humanem Neuroblastom-Gewebe sowie in einer humanen Neuroblastom-Zelllinie (SH-SY5Y) exprimiert werden. Durch immunhistochemische Färbungen wurde eine nukleäre Lokalisation ausgemacht. Gata-4 war jedoch das einzige der vier Proteine, das während der Entwicklung des sympathischen Nervensystems der Maus nicht exprimiert wurde. Seine Einzigartigkeit wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt. So wurden mittels Microarray-Analysen von 251 Neuroblastom-Proben die Expressionen von *GATA-2*, *GATA-3* und *FOG-2* signifikant mit Markern für eine günstige Prognose der Tumorerkrankung assoziiert; *GATA-4* hingegen zeigte eine höhere Expression in den prognostisch ungünstigen *MYCN*-amplifizierten Tumoren. Interessanterweise führte die Überexpression von GATA-4 mittels Lentiviren zu einer Proliferationsinhibition von humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y und SH-EP) sowie zu der verstärkten Expression von *dihydropyrimidinase-like 3* (DPYSL3) und *B-cell CLL/lymphoma 2* (Bcl-2). Zudem konnte durch das Differenzierungsagens Retinsäure die GATA-4 Expression induziert werden.

So wurde in dieser Arbeit mit der höheren Expression von *GATA-2*, *GATA-3* und *FOG-2* und der niedrigeren Expression von *GATA-4* in Neuroblastomen mit günstiger Prognose ein weiterer Beleg dafür gefunden, dass normale Entwicklungsprozesse in diesem Neuroblastom-Subtyp intakt sind. Umgekehrt sind in den Tumoren mit der schlechteren Prognose diese Prozesse gestört. Die *in vitro* verlangsamte Proliferation sowie die Induktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 nach Überexpression von GATA-4 könnten *in vivo* bei der schlechteren Therapierbarkeit der prognostisch ungünstigen Neuroblastome eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass die Behandlung von Neuroblastomen mit Retinsäure u. a. durch Bcl-2 zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen kann. Da die Expression von GATA-4 durch Retinsäure induziert werden und GATA-4 selbst die Expression von Bcl-2 verstärken kann, könnte GATA-4 an der Chemoresistenz beteiligt sein.

1 Einleitung

1.1 GATA-Transkriptionsfaktoren

GATA-Transkriptionsfaktoren umfassen bei Vertebraten eine Gruppe von sechs Zinkfinger-Proteinen, die bei der Zellproliferation und -differenzierung eine entscheidende Rolle spielen (Lowry und Atchley, 2000). Die Konsensus-Sequenz ‚T/AGATAG/A‘, an die die GATA-Faktoren binden, wurde zunächst in einer *Enhancer* Region im 3'-flankierenden Bereich des β -*Globin* Gens beim Huhn und beim Menschen beschrieben (Evans et al., 1988; Wall et al., 1988). Bald darauf identifizierte man GATA-Motive auch in anderen Genen erythroider Zellen wie der Porphobilinogen-Desaminase (Mignotte et al., 1989a; Mignotte et al., 1989b). Als man GATA-Motive auch in den regulatorischen Bereichen von Genen aus anderen hämatopoietischen (nicht-erythroiden) (Romeo et al., 1990; Zon et al., 1991) und nicht-hämatopoietischen Zellen (Wilson et al., 1990) fand, wurde deren weite Verbreitung deutlich. GATA-Transkriptionsfaktoren wurden anfangs auch mit anderen Namen bezeichnet (z. B. Eryf1, NF-E1 und GF-1 für GATA-1); eine einheitliche Nomenklatur wurde 1990 etabliert (Orkin, 1990). Auch leicht abgewandelte Sequenzmotive wie ‚GATT‘ oder ‚GATC‘ können von einzelnen GATA-Faktoren mit unterschiedlicher Präferenz gebunden werden. Dadurch kann in Geweben, in denen mehrere GATA-Proteine koexprimiert werden, die Genregulation durch GATA-Transkriptionsfaktoren gezielt vermittelt werden (Molkentin, 2000).

GATA-Proteine weisen eine hochkonservierte Struktur auf, die zwei sequenzähnliche Zinkfinger der Aminosäuren-Abfolge Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys umfasst. Die beiden Zinkfinger sind durch 29 Aminosäuren voneinander getrennt (Evans und Felsenfeld, 1989; Trainor et al., 1990; Tsai et al., 1989; Zon et al., 1990). Auf die Zinkfinger folgt jeweils eine basische Region (Trainor et al., 1990), wie sie oft sequenznah zu DNA-bindenden Domänen gefunden wird (Brendel und Karlin, 1989). Beide Zinkfinger haben eine unterschiedliche Funktion. Bei GATA-1 konnte nachgewiesen werden, dass der N-terminale Zinkfinger (N-Finger) wichtig für die Sequenzspezifität und Bindungsstabilität ist (Martin

und Orkin, 1990). Zusätzlich beinhaltet der N-Finger eine Aktivierungsdomäne (Yang und Evans, 1992). Über den N-Finger wird beispielsweise auch die Interaktion mit dem wichtigen Kofaktor *friend-of-GATA* (FOG)-2 vermittelt (Holmes et al., 1999; Lu et al., 1999; Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999). Der C-terminale Zinkfinger (C-Finger) wird für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA benötigt; bei Mutationen im C-terminalen Zinkfinger wird die Bindungsaffinität beeinträchtigt (Martin und Orkin, 1990; Yang und Evans, 1992). Des Weiteren ist der C-Finger an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt, z. B. mit den Transkriptionsfaktoren Sp1 oder EKLF der Krüppel-Faktor Familie (Merika und Orkin, 1995).

Aufgrund der Expressionsmuster und Sequenzhomologie wurden GATA-Transkriptionsfaktoren in zwei Untergruppen eingeteilt. Die eine Untergruppe besteht aus GATA-1, -2 und -3, die alle drei wichtige Rollen bei der Hämatopoiese spielen und dabei sowohl überlappende als auch spezifische Funktionen ausüben (Weiss und Orkin, 1995). Zusätzlich weisen GATA-2 und GATA-3 wichtige Funktionen in anderen Organsystemen auf, insbesondere im Nervensystem, der Niere und im Urogenitaltrakt, wie sich durch Analysen von Mäusen mit homozygoter Deletion des *Gata-2* und des *Gata-3* Gens zeigte (Pandolfi et al., 1995; Zhou et al., 2000). Während der Entwicklung des Nervensystems werden *Gata-2* und *Gata-3* in verschiedenen neuronalen Zellen des Hirnstamms und des Rückenmarks exprimiert; beide Faktoren sind zudem entscheidend für die neuronale Spezifikation und Differenzierung des sympathischen Nervensystems (Lim et al., 2000; Nardelli et al., 1999; Pandolfi et al., 1995; Tsarovina et al., 2004; Zhou et al., 2000).

GATA-4, -5 und -6 gehören der anderen Untergruppe an. Sie werden vorwiegend in Geweben mesodermalen und endodermalen Ursprungs exprimiert, wie Herz, Leber, Lunge, Darm und Gonaden (Laverriere et al., 1994; Molkentin, 2000). Neben der unterschiedlichen Präferenz für das GATA-Motiv im jeweiligen Sequenzkontext sowie für abgewandelte GATA-Motive spielen auch individuelle Interaktionen mit Kofaktoren sowie anderen Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der Gewebe-spezifischen Genregulation (Molkentin, 2000).

1.1.1 GATA-4

Das murine *Gata-4* wurde erstmalig 1993 kloniert und mittels Northern Blot und *in situ* Hybridisierung im primitiven Endoderm des Embryos sowie fetal und adult im Herzen, in den Gonaden und im Darmepithel detektiert. Schwache Expressionen fanden sich auch in der adulten Lunge und Leber (Arceci et al., 1993). Später wurde *Gata-4* auch in der fetalen Leber detektiert (Morrissey et al., 1996). Das humane *GATA-4* Gen wurde 1995 kloniert und weist auf Proteinebene innerhalb der Zinkfinger-Region eine Sequenzhomologie von 100% zum murinen *Gata-4* auf (Huang et al., 1995). Maus-Embryonen mit einer homozygoten Deletion des *Gata-4* Gens (*Gata-4*^{-/-}) sterben zwischen den Entwicklungstagen (E) 8,5 und 9,5 aufgrund von Defekten in der Herz- und Darmentwicklung, während sich heterozygote Mäuse (*Gata-4*^{+/-}) normal entwickeln (Kuo et al., 1997; Molkentin et al., 1997). Das murine *Gata-4* Gen befindet sich auf Chromosom 14 (White et al., 1995a) und das humane *GATA-4* Gen auf Chromosom 8p23.1-p22 (Huang et al., 1996).

Im Nervensystem ist *Gata-4* in migrierenden *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH)-sezernierenden Neuronen nachgewiesen worden (Lawson und Mellon, 1998). Diese Neuronen wandern von der olfaktorischen Plakode außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) zum Hypothalamus, exprimieren *Gata-4* aber nicht mehr, wenn sie dort angekommen sind (Lawson und Mellon, 1998). Diese Beobachtung bestätigt auch frühere Studien, die bereits die fehlende Expression von *GATA-4* im Gehirn mittels Northern Blot und *in situ* Hybridisierung zeigten (Arceci et al., 1993; Huang et al., 1995). Im Gegensatz dazu steht eine kürzlich veröffentlichte Studie, welche die Expression von *GATA-4* in verschiedenen Zelltypen des embryonalen, postnatalen und adulten murinen und humanen Gehirns zeigt, so auch in Neuronen und Astrozyten (Agnihotri et al., 2009). Von Pilon *et al.* wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein kleiner Teil migrierender, vermutlich kardialer Neuralleistenzellen *Gata-4* exprimiert, da in Mäusen ein Reportergen unter der Kontrolle eines 5 kb langen *Gata-4* Promotors in migrierenden Neuralleistenzellen detektiert werden konnte (E9,5-E11,5). Eine endogene *Gata-4* Expression konnte jedoch mittels *whole mount in situ* Hybridisierung nicht nachgewiesen werden (Pilon et al., 2008). Auch Neurosphären, generiert aus primitiven neuronalen Stammzellen der Maus (zwischen E5,5 und E8,5), ex-

primieren *Gata-4*. Definitive neuronale Stammzellen (E14,5) exprimieren *Gata-4* jedoch nicht mehr (Hitoshi et al., 2004). In einer anderen Studie wurden im Herzen Gata-4-positive Zellen innerhalb einer Gruppe multipotenter, von Neuralleistenzellen abstammenden Stammzellen detektiert (Tomita et al., 2005).

Zusätzlich zu den bei allen GATA-Proteinen konservierten Zinkfingern fand man beim murinen Gata-4 N-terminal zwei unabhängige Transaktivierungsdomänen sowie in der basischen Region, die auf den C-terminalen Zinkfinger folgt, ein Kernlokalisierungssignal (Abb. 1.1) (Morrisey et al., 1997). Diese Strukturen sind auch beim murinen Gata-5 und -6 vorhanden; zu Gata-1, -2 und -3 weisen jedoch insbesondere die Transaktivierungsdomänen von Gata-4 keinerlei Homologien auf (Molkentin, 2000; Morrisey et al., 1997).

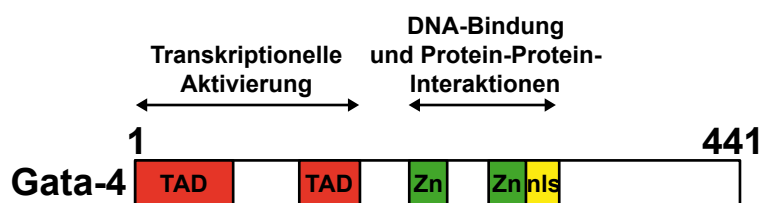


Abb. 1.1: Struktur des murinen Gata-4 (441 Aminosäuren). TAD = Transaktivierungsdomäne; Zn = Zinkfingerdomäne; nls = Kernlokalisierungssignal. Modifiziert nach (Molkentin, 2000).

1.1.1.1 Die Regulation von GATA-4

Die Promotorregion des *GATA-4* Gens von Mensch, Maus und Ratte ist hochkonserviert und beinhaltet keine TATA-Box. Der minimale Promotor, wichtig für die basale *GATA-4* Expression, umfasst in etwa den Bereich 120 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle und enthält für die Promotoraktivität essentielle GC-Boxen und eine E-Box (Mazaud Guittot et al., 2007; Ohara et al., 2006). Das erste Exon wird nicht translatiert (Ohara et al., 2006), und kürzlich sind zusätzlich ein (Ratte) bzw. zwei (Maus, Mensch) alternative erste Exons im Genlokus von *GATA-4* identifiziert worden (Mazaud Guittot et al., 2009). Die Translationsinitiation kann Cap-abhängig oder Cap-unabhängig (*internal ribosome entry site* (IRES)-vermittelt) erfolgen (Sharma et al., 2007).

An der Gewebe-spezifischen Regulation des murinen *Gata-4* sind verschiedene *Enhancer* beteiligt. Einer davon liegt etwa 40 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart und ist während der Embryonalentwicklung im Mesoderm aktiv. Interessanterweise beinhaltet dieser zwei funktionell essentielle GATA-Bindungsstellen (Rojas et al., 2005). Kürzlich wurde ein Endoderm-spezifischer *Enhancer* etwa 80 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart des murinen *Gata-4* identifiziert. Auch dieser beinhaltet eine GATA-Bindungsstelle, die *in vitro* von Gata-4 gebunden werden kann und *in vivo* funktionell intakt ist (Rojas et al., 2009). Diese Studien legen den Schluss nahe, dass GATA-4 selbst (positive Auto-Regulation) oder auch ein anderer GATA-Faktor, z. B. GATA-6 (Morrissey et al., 1998), an der Regulation von GATA-4 beteiligt ist, zumindest in bestimmten Geweben.

Auch eine epigenetische Regulation von *GATA-4* ist beschrieben worden. So geht die fehlende Expression von *GATA-4* in humanen Ovarialtumor-Zelllinien mit der Hypoacetylierung und verminderten Methylierung von Histonen am *GATA-4* Promotor einher (Caslini et al., 2006). Beim humanen kolorektalen und gastralen Karzinom sowie in humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien wird *GATA-4* ebenfalls über epigenetische Mechanismen inaktiviert, hier jedoch durch die Cytosin-Methylierung innerhalb von CpG-Inseln im Promotorbereich (Akiyama et al., 2003; Guo et al., 2004).

1.1.1.2 Posttranslationale Modifikationen von GATA-4

Posttranslationale Modifikationen bei GATA-Faktoren umfassen Sumoylierung, Acetylierung und Phosphorylierung (Viger et al., 2008), wobei die Phosphorylierung von GATA-4 am besten untersucht ist. GATA-4 weist viele evolutionär konservierte potentielle Tyrosin- oder Serin-Phosphorylierungsstellen auf (Morrissey et al., 1997); bisher ist jedoch lediglich die Phosphorylierung an Ser105 und Ser261 nachgewiesen worden (Charron et al., 2001; Kitta et al., 2003; Liang et al., 2001; Tremblay und Viger, 2003). Für die Phosphorylierung sind je nach Stimulus und Gewebe verschiedene Kinasen verantwortlich, z. B. p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (Charron

et al., 2001) oder im intakten adulten Ratten-Herz (Tenhunen et al., 2004), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) im neonatalen und adulten Ratten-Herz (Liang et al., 2001; Tenhunen et al., 2004), Proteinkinase A (PKA) in murinen Leydig-Tumorzellen (Tremblay et al., 2002; Tremblay und Viger, 2003) und Proteinkinase C (PKC) in murinen Muskel-Vorläuferzellen (Wang et al., 2005). Durch die Phosphorylierung wird entweder die DNA-Bindungsaktivität von GATA-4 (Kitta et al., 2003; Morimoto et al., 2000; Tenhunen et al., 2004; Wang et al., 2005) und/oder die transkriptionelle Aktivität erhöht, beispielsweise durch verstärkte Rekrutierung eines Koaktivators (Tremblay und Viger, 2003). Interessanterweise kann durch Phosphorylierung von GATA-4 auch der umgekehrte Effekt erzielt werden. In COS7 Zellen und neonatalen Ratten-Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) GATA-4 phosphorylieren kann. Dieser Vorgang führt durch Stimulation des Kern-Exports von GATA-4 zu einer inhibierten Kern-Akkumulation und somit zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität (Morisco et al., 2001).

Die Sumoylierung des murinen Gata-4 erfolgt durch die Konjugation von SUMO-1 an Lys366 (Komatsu et al., 2004; Wang et al., 2004) und führt ohne Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität Herz-spezifischer Gene (Wang et al., 2004). Möglicherweise spielt hier die Sumoylierung eine Rolle bei der nukleären Translokation von Gata-4 (Wang et al., 2004). Die Acetylierung findet hauptsächlich an vier Lysinen C-terminal vom C-Finger statt (Takaya et al., 2008). Sie erfolgt durch p300 und führt während der Differenzierung embryonaler muriner Stammzellen in Kardiomyozyten zu einer verstärkten Bindung von GATA-4 an eine GATA-Bindungsstelle im Endothelin-1 Promotor. Die verstärkte Bindung wird vermutlich durch gleichzeitige Histonacetylierung begünstigt (Kawamura et al., 2005). Die Acetylierung von GATA-4 durch p300 ist zudem in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten beschrieben worden. Auch hier kommt es zu einer verstärkten DNA-Bindungsaffinität und damit zu einer erhöhten Aktivierung des Endothelin-1 Promotors (Yanazume et al., 2003).

1.1.1.3 GATA-4 in Tumoren

Obwohl GATA-Faktoren zunächst als transkriptionelle Regulatoren der Embryogenese angesehen wurden, werden sie zunehmend mit diversen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. So spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer ganzen Reihe von Tumoren. GATA-4 wurde erstmals in adrenokortikalen Tumoren beschrieben; in der normalen Nebenniere von Maus und Mensch wird es hingegen nicht exprimiert. Dies legt die Hypothese nahe, dass GATA-4 eine Rolle bei Tumorprogression und -wachstum spielt (Kiiveri et al., 1999). GATA-4 Protein konnte auch in Zellkernen von humanen Dottersack-tumorzellen detektiert werden (Siltanen et al., 1999) sowie in Sertoli- und Leydig-Zell-Tumoren, bei denen höhere GATA-4 Expressionslevel gefunden wurden als in den gleichen Zelltypen des umliegenden gesunden Gewebes (Ketola et al., 2000). Kürzlich wurde GATA-4 in *carcinoma in situ* (CIS, präinvasives Karzinom) Zellen des Hodens und in Seminomen nachgewiesen (Salonen et al., 2010). Im Adenokarzinom des Ösophagus liegt das Gen für *GATA-4* in einigen Fällen amplifiziert vor, einhergehend mit einer Überexpression (Lin et al., 2000). Wachstumsfördernde Eigenschaften wurden GATA-4 zudem in Ovarialtumoren (Granulosa- und Thekazelltumoren) zugeschrieben, vermutlich durch Hemmung der Apoptose (Laitinen et al., 2000), wobei auch die Aktivierung des antiapoptotischen Proteins *B-cell CLL/lymphoma* (Bcl)-2 durch GATA-4 eine Rolle spielt (Kyrönlähti et al., 2008). Dies steht im Einklang mit anderen Studien, bei denen GATA-4 als antiapoptotisch identifiziert wurde. So gehen Gata-4-defiziente P19 Zellen, die mittels Dimethylsulfoxid in einen kardialen Phänotyp differenziert werden, in Apoptose. Die Differenzierung stoppt im präkardialen Stadium (Grépin et al., 1997). Auch in ausdifferenzierten Kardiomyozyten der Ratte trägt Gata-4 zum Überleben der Zellen bei, indem es das antiapoptotische Gen *Bcl-X_L* aktiviert (Aries et al., 2004).

Umgekehrt ist *GATA-4* jedoch auch als Tumorsuppressor beschrieben worden. *GATA-4* liegt im kolorektalen und gastralen Karzinom sowie in humanen Bronchialkarzinom- und Ovarialtumor-Zelllinien epigenetisch inaktiviert vor (Akiyama et al., 2003; Caslini et al., 2006; Guo et al., 2004). Interessanterweise ist beim kolorektalen und gastralen Karzinom damit eine simultane epigenetische Inaktivierung potentieller antitumoraler Zielgene ver-

bunden (Akiyama et al., 2003). Auch in einigen humanen Magenkarzinom-Zelllinien fand sich eine Herunterregulation von GATA-4 im Vergleich zur gesunden Magenschleimhaut (Bai et al., 2000). Des Weiteren sind bei Verminderung der *Gata-4* Expression im Ovar der Maus Ovarialteratome aufgetreten (Thurisch et al., 2009), und bei serösen Ovarialkarzinomen wurde ein Verlust des Chromosomenabschnittes 8p21-p23 beobachtet, einhergehend mit einem Verlust der GATA-4 Expression (Lassus et al., 2001). Aus dieser Fülle an unterschiedlichen Beobachtungen wird deutlich, dass GATA-4 sowohl die Funktion eines Tumorsuppressors als auch die eines Onkogens einnehmen kann, je nach Tumor und zellulärem Kontext. Zielgene von GATA-4 in Tumoren, wie Bcl-2 in Granulosazelltumoren (Kyrönlähti et al., 2008), sind bislang jedoch kaum untersucht worden.

1.1.2 FOG-2

Die beiden FOG-Proteine (FOG-1 und FOG-2) stellen wichtige Kofaktoren für die GATA-Proteine dar, wobei für GATA-4 die Interaktion mit FOG-2 am besten untersucht ist. FOG-Proteine selbst können vermutlich nicht an DNA binden; sie üben ihre Funktion über Protein-Protein-Interaktionen aus. *In vitro* kann FOG-2 mit allen GATA-Faktoren interagieren (Cantor und Orkin, 2005), indem es an den N-Finger der GATA-Faktoren bindet (Holmes et al., 1999; Lu et al., 1999; Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999).

Je nach Zelltyp und reguliertem Gen kann FOG-2 als Koaktivator oder Korepressor dienen (Holmes et al., 1999; Lu et al., 1999; Svensson et al., 1999). So üben GATA-4 oder FOG-2 allein keinen oder nur einen geringen Effekt auf den *α -myosin heavy chain* (MHC) Promotor in COS Zellen aus, zusammen führen sie aber zu einer 20-fach erhöhten Promotoraktivität. In Ratten-Kardiomyozyten hingegen kommt es durch alleinige Transfektion mit einem GATA-4 Expressionsplasmid zu einer etwa zweifachen Erhöhung der α -MHC Promotoraktivität, welche durch Kotransfektion mit FOG-2 gehemmt wird (Lu et al., 1999). Ein ähnlich reprimierender Effekt von FOG-2 wurde in NIH3T3 Zellen und Ratten-Kardiomyozyten am *B-type natriuretic peptide* (BNP) Promotor beobachtet. Hier kommt

es durch alleinige Transfektion von GATA-4 zu einer erhöhten BNP Promotoraktivität; durch Zugabe von FOG-2 geht diese aber auf das basale Level zurück (Lu et al., 1999; Svensson et al., 1999).

Der Mechanismus, durch den FOG-Proteine die Aktivierung GATA-regulierter Gene verstärken oder hemmen, ist nicht vollständig verstanden. Durch die GATA-FOG Interaktion kommt es möglicherweise zu Konformationsänderungen, die eine erleichterte oder erschwerte Bindung der GATA-Proteine an die DNA zur Folge haben (Holmes et al., 1999; Svensson et al., 1999). Vermutlich sind an der Interaktion auch noch weitere Proteine beteiligt. Die Repression kann, zumindest in manchen Zellsystemen, durch Interaktion von FOG-2 mit dem Korepressor CtBP vermittelt werden (Holmes et al., 1999). Auch ist diskutiert worden, ob FOG an dem Umbau der Chromatin-Struktur (*chromatin remodeling*) beteiligt ist, um die Bindung von GATA-Proteinen an die DNA zu erleichtern (Cantor und Orkin, 2005).

Während der Entwicklung wird *Fog-2* in vielen Geweben exprimiert, einschließlich des Herzens und des Gehirns (Cantor und Orkin, 2005). Ab E11,5 kann es auch in Ganglien des peripheren Nervensystems (PNS) detektiert werden (Ganglion trigeminale, akustikofaziales Ganglion, Spinalganglien) (Tevosian et al., 1999). Im adulten Organismus wird *FOG-2* vorwiegend im Herzen, Gehirn und Hoden exprimiert (Holmes et al., 1999; Lu et al., 1999; Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999).

Auch in Granulosa- und Thekazelltumoren des Ovars (Anttonen et al., 2005; Laitinen et al., 2000) und in CIS Zellen des Hodens (Salonen et al., 2010) wurde FOG-2 nachgewiesen. Funktionelle Untersuchungen liegen jedoch noch nicht vor.

1.2 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom, erstmals 1864 von Rudolf Virchow beschrieben, ist der häufigste extrakranielle solide Tumor bei Kindern unter 15 Jahren und macht ca. 8% aller Krebserkrankungen im Kindesalter aus (Kaatsch und Spix, 2008). 90% der Erkrankungen werden vor dem 5. Lebensjahr diagnostiziert. Während die Fünfjahres-Überlebensrate bei Säuglingen 80-100% beträgt und häufig spontane Remissionen beobachtet werden, liegt sie bei älteren Patienten mit metastasierter Erkrankung bei lediglich 40%. Das Neuroblastom ist ein Tumor des sympathischen Nervensystems; dementsprechend kann der Primärtumor an verschiedenen Orten lokalisiert sein. Am häufigsten findet sich das Neuroblastom im Bauchraum im Bereich des Nebennierenmarks (ca. 40% der Tumoren), aber auch entlang des sympathischen Grenzstrangs und in den Paraganglien (Fischer et al., 2005a).

1.2.1 Die Entstehung des Neuroblastoms

Während der Neurulation entsteht in der dritten bis vierten Woche der embryonalen Entwicklung des Menschen die Neuralleiste. Deren Zellen migrieren und differenzieren, um neben Melanozyten sowie sensorischen und enterischen Neuronen das sympathische Nervensystem zu bilden (Ulfig, 2005). Das Neuroblastom entsteht aus den sympathischen Vorläuferzellen, nie aber aus den enterischen oder sensorischen neuronalen Vorläuferzellen (Abb. 1.2). Die Ereignisse, die zur Entartung der Zellen führen, sind demnach Zelllinienabhängig, im Übrigen jedoch noch nicht vollständig verstanden. Vermutlich spielen Transkriptionsfaktoren wie der für die Prognose wichtige Transkriptionsfaktor *MYCN* eine entscheidende Rolle (Nakagawara und Ohira, 2004; Wakamatsu et al., 1997). Aber auch Neurotrophinrezeptoren (Tyrosinkinase-Rezeptoren A und B (TrkA und TrkB)) und deren Signaltransduktionswege, die während der Entwicklung an der Differenzierung der Zellen der Neuralleiste beteiligt sind, scheinen bei der malignen Transformation involviert zu sein. So ist die Expression von TrkA signifikant mit einer günstigen Prognose des Neuro-

blastoms assoziiert (Nakagawara et al., 1993); für TrkB gilt das Gegenteil (Nakagawara et al., 1994).

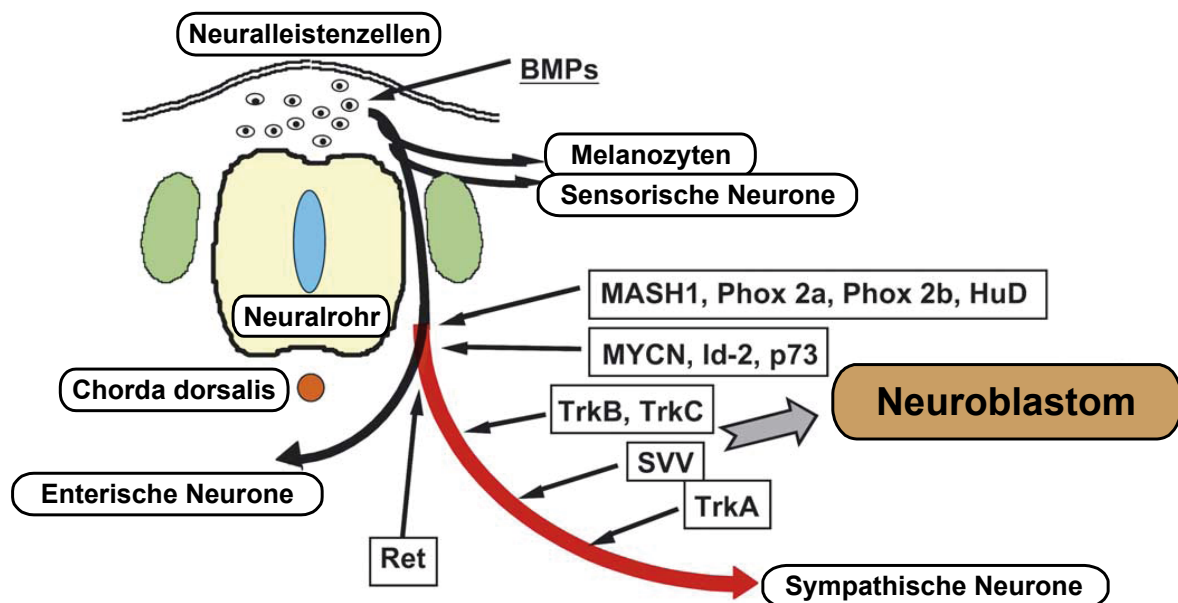


Abb. 1.2: Die Entwicklung der Neuralleistenzellen und die Entstehung des Neuroblastoms. Wichtige, an der Entwicklung der sympathischen Neurone beteiligte Proteine sind u. a. die Transkriptionsfaktoren MASH1, Phox 2a, Phox 2b, MYCN und p73, das RNA-bindende Protein HuD, *inhibitor of DNA binding* (Id)-2, die Tyrosinkinase-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und Ret sowie der Apoptose-Inhibitor Survivin (SVV). BMP = *bone morphogenetic protein*. Modifiziert nach (Nakagawara und Ohira, 2004).

Es wird vermutet, dass ein früher Stop in der Entwicklung noch unreifer Zellen zu einem Neuroblastom mit ungünstiger Prognose führt, während prognostisch günstige Neuroblastome durch einen Differenzierungsstop in der späten neuronalen Entwicklung aus Neuroblasten hervorgehen (Nakagawara und Ohira, 2004). Zudem mehren sich Hinweise, dass Marker der neuronalen Differenzierung in Tumoren mit ungünstiger Prognose herunterreguliert sind (Fischer et al., 2006; Nakagawara und Ohira, 2004; Ohira et al., 2003). Daher wird angenommen, dass eine Deregulation der normalen Entwicklung zur Pathogenese der biologisch sehr variablen Neuroblastom-Subtypen beiträgt. Dafür spricht auch die Assozia-

tion diverser an der Entwicklung des sympathischen Nervensystems beteiligten Gene (z. B. TrkA und TrkB) mit den prognostisch unterschiedlichen Subtypen des Neuroblastoms.

1.2.2 Prognostische Faktoren für die Risikoabschätzung beim Neuroblastom

Eine außergewöhnliche Eigenschaft des Neuroblastoms besteht in seiner sehr ausgeprägten klinischen und biologischen Heterogenität. Je nach lokaler Ausbreitung, Resektabilität und Metastasierung werden Neuroblastome gemäß dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) in die Stadien 1, 2a und 2b, 3, 4, und 4S eingeteilt (Brodeur et al., 1993). Das Stadium 4S (S = *special*) beschreibt einen kleinen, lokalisierten Primärtumor mit Metastasen, die jedoch auf Leber, Haut und/oder Knochenmark beschränkt sind (D'Angio et al., 1971). Patienten mit einem Tumor des Stadiums 4S sind *per definitionem* jünger als ein Jahr alt und haben eine gute Prognose, da sich der Tumor fast immer spontan zurückbildet. Das INSS ist insofern limitiert, als eine Stadieneinteilung erst nach Operation möglich ist. Daher hat sich eine *International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Task Force* mit der Zielsetzung gebildet, Tumoren bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und vor jeglicher Therapie einzuteilen, woraus das *INRG Staging System* (INRGSS) hervorgegangen ist (Monclair et al., 2009). Für die Einteilung nach dem INRGSS sind u. a. bildgebende Verfahren wie Computer- und/oder Kernspintomographie sowie ^{123}Jod -Metajodbenzylguanidin (MIBG)-Szintigraphie erforderlich. L1 und L2 repräsentieren dabei lokalisierte bzw. lokoregionale Tumoren und M solche mit Metastasen. Das Stadium MS gleicht im Wesentlichen dem Stadium 4S des INSS, wobei die Altersbegrenzung auf 18 Monate gesetzt wurde (Monclair et al., 2009). Vermutlich werden zukünftig im Rahmen von kooperativen Studien beide Systeme der Stadieneinteilung parallel verwendet werden (Mueller und Matthay, 2009).

Histopathologisch werden neuroblastische Tumoren (Neuroblastom, Ganglioneuroblastom, Ganglioneurom) nach der *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) eingeteilt, was unter Hinzunahme des Alters bei Diagnose und des Mitose-Karyorrhexis-

Index (MKI) auch prognostische Relevanz hat (Shimada et al., 1999a; Shimada et al., 1999b). Man unterscheidet zwischen Stroma-armen und Stroma-reichen Tumoren, je nach dem relativen Anteil der beiden zellulären Komponenten Schwann-Zellen und Neuroblasten. Das Neuroblastom gehört zu den Stroma-armen neuroblastischen Tumoren, während die prognostisch günstigeren Ganglioneurome und Ganglioneuroblastome zu den Stroma-reichen bzw. Stroma-dominanten Tumoren gehören. Das Neuroblastom wird weiterhin nach dem Anteil differenzierender Neuroblasten in undifferenzierte, gering differenzierte und differenzierende Neuroblastome unterteilt, wobei ein höherer Differenzierungsgrad streng mit einer besseren Prognose korreliert ist (Shimada et al., 1999a; Shimada et al., 1999b). Bei Neuroblastomen mit günstiger Prognose ist eine spontane Differenzierung in benigne Ganglioneurome möglich (Cushing und Wolbach, 1927; Loretz, 1870).

In Neuroblastomzellen sind diverse prognostisch ungünstige chromosomale Aberrationen beobachtet worden. Eine für die Risikoabschätzung des Tumors wichtige Aberration ist die Amplifikation des Neuroblastom-spezifischen Onkogens und Transkriptionsfaktors *MYCN*. *MYCN* wurde erstmals im Jahr 1983 als ein Homolog zum Proto-Onkogen *c-myc* beschrieben und liegt in einer Reihe von Neuroblastom-Zelllinien und humanem Neuroblastom-Gewebe amplifiziert vor (Kohl et al., 1983; Schwab et al., 1983). Das Gen für *MYCN* ist auf Chromosom 2p24 lokalisiert (Garson et al., 1987; Kohl et al., 1983; Schwab et al., 1984; Shibasaki, 1994). Die Amplifikation, definiert als mindestens fünffache Vervielfältigung des Gens, kommt bei 20-25% der Primärtumoren vor (Maris und Matthay, 1999) und geht mit einer schlechteren Prognose einher (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985). Durch Experimente, bei denen *MYCN* in Neuroblastomzellen herunterreguliert wurde, konnte gezeigt werden, dass *MYCN* an Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist (Nara et al., 2007; Negroni et al., 1991). Die *in vivo* Relevanz von *MYCN* bestätigte sich durch die Überexpression von *MYCN* in Zellen der Neuralleiste in transgenen Mäusen, die in der Folge Neuroblastome entwickelten (Weiss et al., 1997). *MYCN* trägt demnach beim Neuroblastom zur Tumorgenese bei. Kürzlich wurde gefunden, dass *MYCN* an den eigenen Promotor binden kann, um seine eigene Transkription zu aktivieren (positive Auto-Regulation) (Suenaga et al., 2009). Die in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich benutzten

Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und SH-EP amplifizieren beide *MYCN* nicht. *MYCN* Expressionslevel werden jedoch nicht nur durch die Gen-Amplifikation bestimmt, sondern auch durch die transkriptionelle Aktivität. Diese ist bei SH-SY5Y Zellen höher als bei SH-EP Zellen. So exprimieren SH-SY5Y Zellen *MYCN*, während es bei SH-EP Zellen nicht detektierbar ist (Cohen et al., 2003; Sadée et al., 1987).

Eine andere prognostisch ungünstige genetische Aberration betrifft die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p36.3) und dadurch meist den Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*/LOH) dieser Chromosomenregion (Attiyeh et al., 2005; Brodeur et al., 1977; White et al., 1995b). Diese Veränderung wird bei bis zu 36% der Primärtumoren beobachtet und tritt häufig assoziiert mit der Amplifikation von *MYCN* auf (Caron et al., 1993; Fong et al., 1989; Spitz et al., 2004). Deletionen des Chromosoms 11q (11q23.3) werden bei etwa einem Drittel der Patienten gefunden. 11q23 LOH ist selten mit einer Amplifikation von *MYCN* assoziiert, aber dennoch prognostisch ungünstig (Attiyeh et al., 2005). Auch Zugewinne von genetischem Material kommen vor, wie etwa des langen Arms von Chromosom 17. Dies stellt vermutlich die häufigste genetische Aberration beim Neuroblastom dar und kommt bei bis zu 75% der Primärtumoren vor (Maris und Matthay, 1999). Interessanterweise treten der Verlust von Chromosom 1p und der Gewinn von 17q oft zusammen auf; genetisches Material des Chromosoms 1p wird dabei häufig durch solches vom Chromosom 17q ersetzt, wobei das ursprüngliche Chromosom 17 erhalten bleibt (unbalancierte 1;17 Translokation) (Savelyeva et al., 1994; Van Roy et al., 1994). Der Zugewinn von genetischem Material des Chromosoms 17 ist wie die anderen Aberrationen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Caron, 1995; Lastowska et al., 1997).

Auch anhand des DNA-Gehaltes in der Tumorzelle kann zwischen prognostisch ungünstigen und günstigen Neuroblastomen unterschieden werden. Di- und tetraploide Chromosomensätze findet man in der Mehrzahl der Neuroblastom-Zelllinien und in den Primärtumoren des Stadiums 4. Hier sind auch strukturelle Chromosomenveränderungen (Amplifikation, Deletion, unbalancierte Translokation) häufig vorhanden. Diese Tumoren haben klinisch eine schlechtere Prognose. Die Tumoren mit einem hyperdiploiden oder nahe-

triploiden DNA-Gehalt hingegen sind besonders bei Säuglingen durch einen Zugewinn ganzer Chromosomen gekennzeichnet, weisen aber nur selten strukturelle Veränderungen auf. Sie sind häufig bei den lokalisierten Stadien und beim Stadium 4S zu finden und daher mit einer günstigen Prognose assoziiert (Brodeur et al., 1997).

Bereits in einer Studie von 1959 zeigte sich, dass das Alter bei Diagnose des Neuroblastoms einen Einfluss auf die Heilungschance hat, wobei jüngere Patienten (unter einem Jahr) eine deutlich bessere Prognose haben als ältere Patienten (Gross et al., 1959). Das Alter bei Diagnose hat sich daher als ein wichtiger Marker bei der Risikoeinteilung des Neuroblastoms etabliert. In jüngerer Zeit wurde vorgeschlagen, die Altersbegrenzung etwas höher zu setzen und Patienten mit einem Alter von bis zu 18 Monaten einer Niedrigrisiko-Gruppe zuzuteilen, die sich somit einer weniger intensiven Therapie unterziehen müssten (Cohn et al., 2009; London et al., 2005).

Nach einem kürzlich veröffentlichten Schema der Risikoeinteilung der INRG *Task Force* sollen folgende Parameter in Zukunft zu Hilfe genommen werden, um die Patienten vor Behandlung in 16 verschiedene Gruppen einzuteilen: Stadium nach INRGSS, Alter bei Diagnose, Histologie, Differenzierungsgrad, *MYCN*-Status, 11q-Aberration und Ploidität. Daraus ergeben sich vier Risikogruppen: sehr niedriges, niedriges, mittleres und hohes Risiko. Dieses Schema soll den Vergleich internationaler Risiko-basierter Studien erleichtern (Ambros et al., 2009; Cohn et al., 2009).

Die Risikoeinschätzung beim Neuroblastom ist jedoch trotz der Fülle an bereits etablierten Markern noch nicht optimal, so dass es immer noch zu Fehleinschätzungen kommt. Zusätzlich gibt es das Problem der intratumoralen Heterogenität. Auch wenn es ein eher seltenes Phänomen darstellt (Theissen et al., 2009), können z. B. nur vereinzelte Foki innerhalb eines Tumors eine Amplifikation des *MYCN* Gens aufweisen, was die Einteilung erschwert (Kerbl et al., 2002). Umso wichtiger bleibt es, geeignete phänotypische und molekulare Marker zu identifizieren, die es erlauben, den Tumor korrekt einzuordnen und über das optimale Therapieprotokoll zu entscheiden. In den letzten Jahren verstärkten sich die Bemühungen, Genexpressionsprofile von Neuroblastomen zu charakterisieren, um an-

hand dieser Profile die Vorhersage des natürlichen Krankheitsverlaufs besser abschätzen zu können. Eine Methode ist die *prediction analysis for microarrays* (PAM)-Klassifizierung, welche auch in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt wird. Sie basiert auf Genexpressionsprofilen anhand von Microarray-Analysen und hat sich in der Einteilung von Neuroblastomen in solche mit niedrigem, mittlerem und hohem Risiko im Vergleich mit anderen Risikostratifizierungen bewährt (Oberthuer et al., 2006).

1.2.3 Therapie des Neuroblastoms

Entsprechend der Einteilung der Tumoren in Risikogruppen reicht das Spektrum der Therapieansätze von der vollständigen Tumorresektion bis hin zu umfassenden Maßnahmen wie Chemotherapie (mit eventuell nachfolgender autologer Stammzelltransplantation), Strahlentherapie, Immuntherapie und dem Einsatz von Retinsäure (Fong und Park, 2009). Da Retinsäure auch in der vorliegenden Arbeit als Differenzierungsagens *in vitro* verwendet wird, wird im Folgenden darauf näher eingegangen.

1.2.3.1 Retinsäure

Das Vitamin A-Derivat all-*trans* Retinsäure (ATRA) spielt eine wichtige Rolle während der frühen Entwicklung des Nervensystems. So stimuliert sie in der Neurogenese die neuronale Spezifikation und Differenzierung sowie das Neuritenwachstum. ATRA ist ein Ligand des Retinsäure-Rezeptors (*retinoic acid receptor*/RAR), ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptor-Superfamilie. Drei separate Gene kodieren für die Subtypen RAR α , β und γ . RAR bindet als Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR; α , β oder γ) an bestimmte Zielsequenzen der DNA, die *retinoic acid response elements* (RAREs). Erst durch Liganandenbindung fällt jedoch ein Repressorkomplex ab, Koaktivatoren werden rekrutiert und Zielgene der Retinsäure werden aktiviert (Blumberg, 1997; Clagett-Dame et al., 2006). Neuroblastom-Zelllinien reagieren auf Retinsäure mit einer Hemmung der Proliferation

und verlängerten Neuriten (Sidell et al., 1983). Dies gilt auch für die in dieser Arbeit verwendeten SH-SY5Y Zellen (Påhlman et al., 1984). Die hier ebenfalls verwendeten SH-EP Zellen hingegen vermindern lediglich ihre Proliferation, differenzieren jedoch nicht (Ciarapica et al., 2009). SH-EP Zellen gehören zum Typ S, der später näher erläutert wird. Andere Studien wiederum berichten, dass Zellen des S-Typs nach Retinsäure-Behandlung in Apoptose gehen (Piacentini et al., 1992). Retinsäure kann demnach unterschiedliche Effekte auf Neuroblastomzellen ausüben.

Für die Therapie des Neuroblastoms werden das natürlich vorkommende ATRA, aber auch die synthetischen Derivate 13-*cis* Retinsäure und Fenretinid eingesetzt. Sie unterscheiden sich in ihren biologischen und chemischen Eigenschaften, vor allem in ihrer intrazellulären Verfügbarkeit und Halbwertszeit. Da 13-*cis* Retinsäure eine schlechte Affinität zu Retinsäure-Rezeptoren hat, wird vermutet, dass 13-*cis* Retinsäure eine Vorstufe von ATRA darstellt. Aufgrund der längeren Halbwertszeit und der in der Therapie konstanteren Konzentrationen (ATRA wird schneller metabolisiert), wird für die Therapie des Neuroblastoms 13-*cis* Retinsäure bevorzugt. Für *in vitro* Experimente hat sich jedoch eher ATRA durchgesetzt (Reynolds et al., 2003).

Durch die Behandlung von Neuroblastomzellen mit Retinsäure nimmt auch die Expression von *MYCN* ab, und zwar bevor die morphologische Differenzierung der Zellen sichtbar wird, wie am Beispiel der humanen SMS-KCNR Zellen gezeigt wurde (Thiele et al., 1985).

1.2.4 Neuroblastom-Zelllinien

Die klinische Heterogenität des Neuroblastoms spiegelt sich auch in der Fülle der zur Verfügung stehenden Neuroblastom-Zelllinien wider. Sie stammen von aggressiven Tumoren der INSS Stadien 3 und 4 ab und stellen zunächst eine morphologisch heterogene Population dar, wobei man drei verschiedene Zelltypen unterscheidet: N-Typ, S-Typ und I-Typ

Zellen (Biedler et al., 1973; Rettig et al., 1987; Tonini, 1993; Tumilowicz et al., 1970). Die N-Typ Zellen haben eine Neuroblasten-ähnliche Morphologie mit einem kleinen Zellkörper und meist kurzen Neuriten-Ausläufern. Die nicht-neuronalen S-Typ Zellen sind größer, flacher und adhärenter mit einer Fibroblasten-/Schwann-Zell-ähnlichen Morphologie. S-Typ Zellen sind in Nacktmäusen weniger kanzerogen als N-Typ Zellen (Tonini, 1993). Der „intermediäre“ (I-) Typ zeigt biochemische und morphologische Eigenschaften des N- und S-Typs (Rettig et al., 1987). Es wird diskutiert, ob der I-Typ eine Art Stamm-/Vorläuferzelle des N- und S-Typs darstellt (Ciccarone et al., 1989). N- und S-Typ Zellen findet man häufig parallel in einer Zelllinie. Durch Subklonierung können sie voneinander isoliert werden und in vielen Fällen als isolierte Zelllinien weiter kultiviert werden. Zudem ist gezeigt worden, dass beide Typen bidirektional und spontan ineinander umgewandelt werden können (*bidirectional interconversion*) und dabei die morphologischen und biochemischen Eigenschaften des anderen Typs annehmen (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 1983). Jedoch ist dieses Modell auch in Frage gestellt worden. Statt der Interkonversion schlagen Cohen *et al.* vor, dass die isolierten N- oder S-Typ Zellen nicht rein sind und sich unter bestimmten Bedingungen einer der beiden Zelltypen durchsetzt; die Autoren favorisieren demnach ein Modell der klonalen Expansion (Cohen et al., 2003).

Sowohl SH-SY5Y als auch SH-EP Zellen sind Subklone der Zelllinie SK-N-SH (Ross et al., 1983), welche aus einer Knochenmarksbiopsie von einem 4 Jahre alten Mädchen mit metastasiertem Neuroblastom kultiviert wurde (Biedler et al., 1973). SH-SY5Y Zellen haben Eigenschaften fetaler Neuronen und exprimieren die neuronalen Marker Neuropeptid Y und *growth-associated protein* (GAP)-43 (Stolze et al., 2002). Sie gehören zu den N-Typ Zellen. SH-EP Zellen hingegen zählen zu dem S-Typ und exprimieren keine neuronalen Marker. Eine spontane bidirektionale Interkonversion ist auch zwischen diesen beiden Zelllinien beschrieben worden (Ross et al., 1983).

1.3 Zielstellung

GATA-Transkriptionsfaktoren sind für die normale Entwicklung zahlreicher Organe essentiell. Ihre Deregulation ist jedoch auch mit Erkrankungen in Verbindung gebracht worden, u. a. mit malignen Tumoren. Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, der von den sympathischen Vorläuferzellen des autonomen Nervensystems ausgeht. Sowohl *Gata-2* als auch *Gata-3* sind wichtig für die Differenzierung sympathischer Neurone (Lim et al., 2000; Tsarovina et al., 2004); deren Expression ist zudem bereits in einigen Neuroblastom-Zelllinien beschrieben worden (Minegishi et al., 2005; Scherzer et al., 2008; Wallach et al., 2009; Yang et al., 1994). Die Expressionen von GATA-4 und FOG-2 im sich entwickelnden sympathischen Nervensystem sowie im Neuroblastom waren jedoch nicht bzw. nur unvollständig untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionen von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 während der Entwicklung des sympathischen Nervensystems und im Neuroblastom zu vergleichen. Anhand von primären humanen Neuroblastom-Proben sollten zudem verschiedene Subtypen des Neuroblastoms, eingeteilt nach klinischen und genetischen Kriterien, hinsichtlich ihrer Expressionen der vier Faktoren untersucht werden. Ausgehend von diesen Analysen sollten die Funktionen von GATA-4 und FOG-2 im Neuroblastom geklärt werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf dem Poliferationsverhalten und der Morphologie der Zellen nach lenti-viraler Überexpression von GATA-4 und/oder FOG-2. Mit Hilfe von Microarray-Analysen sollten mögliche Zielgene identifiziert werden. Ferner galt es herauszufinden, ob das Differenzierungsagens Retinsäure die Expressionen der GATA-Faktoren oder FOG-2 in Neuroblastomzellen moduliert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Geräte und Hersteller.

Gerät	Hersteller
ABI PRISM [®] 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Brutschrank	Heraeus
CO ₂ -Inkubator	Binder
Einfrierbox	Nalgene
Fisherbrand [®] UV-Transilluminator FT-28 254 312	Fisher Scientific
GeneFlash (Geldokumentation)	Syngene
iCycler iQ [™] Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Kamera AxioCAM MRc (für beide Mikroskope)	Carl Zeiss
Kryostat CM1900-1-VDE	Leica
Mastercycler gradient	Eppendorf
Microplate Reader Infinite [®] 200	Tecan
Mikroskop Axioplan 2 imaging	Carl Zeiss
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Mini- und Midicell Primo (für Agarose-Gelelektrophorese)	Thermo Scientific
Mini-PROTEAN [®] 3 Cell System (für SDS-PAGE)	Bio-Rad Laboratories
PerfectBlue [™] Semi-Dry Elektrobloetter, Sedec M	peqlab Biotechnologie
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories
Schüttelinkubator 3033	GFL
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zentrifuge RC5C Plus; Rotoren SLA-1500 und SS-34	Sorvall
Zentrifugen 5415 D, 5417 R, 5810 R	Eppendorf

2.1.2 Computerprogramme

Tab. 2.2: Computerprogramme und Hersteller.

Programm	Hersteller
Adobe® Photoshop® CS3 Extended	Adobe Systems
AxioVision 4.2	Carl Zeiss
Chromas Lite 2.0	Technelysium
iCycler iQ™ 3.1.7050	Bio-Rad Laboratories
PASW® Statistics	SPSS
Vector NTI®	Invitrogen

2.1.3 Chemikalien

Tab. 2.3: Chemikalien und Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Roche
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP	Hartmann Analytic
Agar-Agar	Carl Roth
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye	Sigma-Aldrich
BSA Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth
Complete und Complete Mini, Protease-Inhibitor-Cocktail (Tabletten)	Roche
Cryo-M-Bed	Bright Instrument

D(+)-Glukose	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase-/RNase-freies destilliertes Wasser	Sigma-Aldrich
dNTP Set, je [100 mM]	Invitrogen
ECL Detection Reagents	GE Healthcare
Essigsäure	Merck
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid [10 mg/ml]	Invitrogen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth
Formaldehyd, mindestens 37%	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Serva
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
Ketamin	Curamed Pharma
Methanol	J. T. Baker
Milchpulver	Carl Roth
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat	Acros Organics
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natronlauge [5 N]	Merck
Oligo(dT) ₁₅ Primer [0,5 µg/µl]	Promega
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Phenol:Chloroform (5:1)	Sigma-Aldrich

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol 6000	Carl Roth
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories
Rinderserumalbumin (BSA) [10 mg/ml]	New England Biolabs
RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor [40 U/μl]	Promega
Rompun [®]	Bayer
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
Saccharose	Merck
SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Tris	Carl Roth
Tris Hydrochlorid	Carl Roth
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton	Carl Roth
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich
UltraPure [™] Agarose	Invitrogen

2.1.4 Enzyme

Tab. 2.4: Enzyme und Hersteller.

Enzym	Hersteller
CIAP (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>) [1 U/μl]	Invitrogen
GoTaq [™] DNA Polymerase [5 U/μl]	Promega
Lysozym [≥ 40000 U/mg]	Sigma-Aldrich
<i>Pfu</i> DNA Polymerase [3 U/μl]	Promega
Proteinase K [≥ 30 U/mg]	Carl Roth

Restriktionsendonukleasen [10-20 U/ μ l]	New England Biolabs
Reverse Transkriptase (M-MLV RT) [200 U/ μ l]	Invitrogen
RNase A [100 mg/ml]	Qiagen
T4 DNA Ligase [400 oder 2000 U/ μ l]	New England Biolabs

Tab. 2.5: Enzympuffer und Hersteller.

Enzympuffer	Hersteller
5x Green GoTaq TM Buffer	Promega
10x NEBuffer (Puffer der Restriktionsendonukleasen)	New England Biolabs
10x Reaction Buffer with MgSO ₄	Promega
10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs

2.1.5 Antikörper

Tab. 2.6: Primäre Antikörper. Die Antikörper wurden für den Western Blot in 5% (w/v) Milchpulver/TBST, für die Immunhistochemie in Blocklösung für IHC verdünnt. ChIP = Chromatin-Immunpräzipitation; IHC = Immunhistochemie; WB = Western Blot.

Antigen	Spezies	Verdünnung bzw. Menge	Hersteller (Katalog-Nr.)
Acetyl. Histon H3	Kaninchen polyklonal IgG	10 μ g (ChIP)	Upstate (06-599)
β -III-Tubulin (TUBJ-1)	Maus monoklonal IgG1	1:500 (IHC)	Abcam (ab53234)
β -Actin	Maus monoklonal IgG2a	1:10000 (WB)	Sigma-Aldrich (A5441)
Bcl-2	Kaninchen monoklonal IgG	1:1000 (WB)	Cell Signaling (50E3)
FOG-2	Kaninchen polyklonal IgG	1:500 (IHC) 1:200 (WB)	Santa Cruz (sc-10755)

GATA-2	Ziege polyklonal IgG	1:200 (IHC)	Santa Cruz (sc-1235)
GATA-3	Ziege polyklonal IgG	1:200 (IHC)	Santa Cruz (sc-1236)
	Maus monoklonal IgG1	1:100 (WB)	Santa Cruz (sc-268)
GATA-4	Maus monoklonal IgG2a	1:200 (IHC)	Santa Cruz (sc-25310)
		10 µg (ChIP)	
	Ziege polyklonal IgG	1:2500 bis 1:5000 (WB)	Santa Cruz (sc-1237X)

Tab. 2.7: Sekundäre Antikörper. Die Antikörper wurden für den Western Blot in 5% (w/v) Milchpulver/TBST, für die Immunhistochemie in Blocklösung für IHC verdünnt. HRP = Meerrettich-Peroxidase; IHC = Immunhistochemie; M = Maus-Gewebeschnitte; NB = Neuroblastom-Gewebeschnitte; WB = Western Blot; ZL = Zelllinie SH-SY5Y.

Gerichtet gegen	Spezies	Kopplung	Verdünnung	Hersteller (Katalog-Nr.)
Ziege IgG	Esel	Alexa Fluor [®] 488	1:500 (IHC)	Invitrogen (A11055)
Maus IgG1	Ziege	Alexa Fluor [®] 488	1:500 (IHC)	Invitrogen (A21121)
Maus IgG2a	Ziege	Alexa Fluor [®] 594	1:500 (IHC ZL+M) 1:5000 (IHC NB)	Invitrogen (A21135)
Kaninchen IgG	Esel	Cy3	1:5000 (IHC ZL) 1:1500 (IHC NB) 1:1000 (IHC M)	Jackson Immunoresearch (711-165-152)
Maus IgG	Ziege	HRP	1:10000 (WB) 1:2000 (bei GATA-3 WB)	Santa Cruz (sc-2005)
Ziege IgG	Kaninchen	HRP	1:10000 (WB)	Santa Cruz (sc-2768)
Kaninchen IgG	Ziege	HRP	1:10000 (WB)	Santa Cruz (sc-2004)

2.1.6 DNA- und Protein-Marker

Tab. 2.8: DNA- und Protein-Marker sowie deren Hersteller.

Marker	Hersteller
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories

2.1.7 Primer

Die Primersequenzen wurden nach den üblichen Kriterien (u. a. Spezifität, 17-25 Nukleotide, G/C-Gehalt 50-60%, Schmelztemperatur-Unterschied zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer unter 4°C, keine Haarnadel-Strukturen der Primer, keine Komplementärsequenzen zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, keine Polypyrimidin- oder Polypurin-Abschnitte) oder mit Hilfe des Programms Primer-BLAST (NCBI) entworfen.

Tab. 2.9: Primer für die semiquantitative PCR. Die Annealing-Temperatur (T_A) ist in °C angegeben. FW = Vorwärtsprimer; RV = Rückwärtsprimer.

Gen (GenBank® No.)	Primersequenz	T_A	Produkt- größe
<i>β-Actin</i> (NM_001101)	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' (FW)	60	353 bp
	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3' (RV)		
<i>Bcl-2</i> (NM_000633)	5'-ACAACATCGCCCTGTGGATGAC-3' (FW)	60	409 bp
	5'-ATAGCTGATTCGACGTTTTGCC-3' (RV)		
<i>DPYSL3</i> (NM_001387)	5'-TGTCCATACTCACTTCCAGATGCC-3' (FW)	60	174 bp
	5'-ATCAGCCCACTCTCTCCATTTCTC-3' (RV)		
<i>FOG-2</i> (NM_012082)	5'-ACGACCCTCCACTGAAGAGGTCTG-3' (FW)	60	397 bp
	5'-GACGTGGTCGTCCGCTCAGACTG-3' (RV)		
<i>GATA-2</i> (NM_032638)	5'-CAGAACCGACCACTCATCAAGC-3' (FW)	60	322 bp
	5'-AGCCAGGGCAGCTGCACTGAAG-3' (RV)		

<i>GATA-3</i> (NM_002051)	5'-TGTCTGCAGCCAGGAGAGCAG-3' (FW)	60	383 bp
	5'-TGGTGTGGTCCAAAGGACAGG-3' (RV)		
<i>GATA-4</i> (NM_002052)	5'-CTCCTTCAGGCAGTGAGAGCC-3' (FW)	60	368 bp
	5'-GGTCCGTGCAGGAATTTGAGG-3' (RV)		
	5'-GATTATGTCCCCGTGACTGT-3' (RV2) (für Nachweis der Überexpression)	60	323 bp
<i>WPRE</i> (J04514)	5'-CCGTTGTCAGGCAACGTG-3' (FW)	58	282 bp
	5'-CGTAGCAGAAGGACGTCC-3' (RV)		

Tab. 2.10: Humane TaqMan® Gene Expression Assays. Primer- und Sondengemische von Applied Biosystems für die Real-time PCR der cDNA aus den Retinsäure-Experimenten.

Gen	Assay ID
<i>β-Actin</i>	Hs99999903_m1
<i>GATA-4</i>	Hs00171403_m1

Tab. 2.11: Real-time PCR Primer. Primer für die Real-time PCR der cDNA aus humanem Neuroblastom-Gewebe. FW = Vorwärtsprimer; RV = Rückwärtsprimer.

Gen (GenBank® No.)	Primersequenz
<i>FOG-2</i> (NM_012082)	5'-GCTTCTATTTTGCCACAGC-3' (FW)
	5'-CTTCTCTTTGCCTCCCACTG-3' (RV)
<i>GATA-2</i> (NM_032638)	5'-GCTGCACAATGTTAACAGGC-3' (FW)
	5'-TCTCCTGCATGCACTTTGAC-3' (RV)
<i>GATA-3</i> (NM_002051)	5'-TTAACATCGACGGTCAAGGC-3' (FW)
	5'-GGTAGGGATCCATGAAGCAG-3' (RV)
<i>GATA-4</i> (NM_002052)	5'-AGGCCTCTTGCAATGCGGA-3' (FW)
	5'-CTGGTGGTGGCGTTGCTGG-3' (RV)

Tab. 2.12: Klonierungs-Primer. Die Annealing-Temperatur (T_A) ist in °C angegeben. FW = Vorwärtsprimer; RV = Rückwärtsprimer. Fett gedruckt die in 2.2.1.5 angegebenen Restriktionsenzyme. Die Fragmentlängen beziehen sich auf die Längen nach Schneiden durch die Restriktionsenzyme.

Gen (GenBank® No.)	Primersequenz	T_A	Fragmentlänge
<i>FOG-2</i> Teil I (AF119334)	5'-TATA AGATCT GCCGCCGAGATGTCC CGGCGAAAG-3' (FW)	55	954 bp
	5'-GTGTGAATTCAGGTGCATT TCTAGA G-3' (RV)		
<i>FOG-2</i> Teil II (AF119334)	5'-AA ACTCTAGAA ATGCACCTGAATT C-3' (FW)	55	2525 bp
	5'-TATA CTCGAGT CATTTGACATGTTCT GCTGC-3' (RV)		
<i>GATA-4</i> (NM_002052)	5'-TATA AGATCT CACCATGTATCAGAG CTTGGCC-3' (FW)	60	1343 bp
	5'-TATA CTCGAGT TACGCAGTGATTATG TCCCCG-3' (RV)		

Tab. 2.13: Northern Blot-Primer. Primer zur Herstellung der Sonden für den Northern Blot. Die Annealing-Temperatur (T_A) ist in °C angegeben. FW = Vorwärtsprimer; RV = Rückwärtsprimer. Die Primer für *GATA-2*, *GATA-3* und *FOG-2* entsprechen denen aus Tab. 2.9.

Gen (GenBank® No.)	Primersequenz	T_A	Produkt- größe
<i>β-Actin</i> (NM_001101)	5'-GATTTAAAACTGGAACGGTGAAG-3' (FW)	60	159 bp
	5'-TAGGATGGCAAGGGACTTCCTG-3' (RV)		

Tab. 2.14: ChIP-Primer. Primer zur Amplifikation genregulierender Sequenzen am Ende des ChIP-Assays. Die Annealing-Temperatur (T_A) ist in °C angegeben. FW = Vorwärtsprimer; RV = Rückwärtsprimer.

Gen (GenBank® No.)	Primersequenz	T_A	Produkt- größe
<i>Bcl-2</i> (AC021803)	5'-TTGTAGTGTGTATGCCCTG-3' (FW)	55	230 bp
	5'-CGGAACACTTGATTCTGGTG-3' (RV)		
<i>DPYSL3</i> (AF246692)	5'-CTCCGCTCCCGAAAAGC-3' (FW)	60	200 bp
	5'-AGCTGGGACCCCATAAGACA-3' (RV)		
<i>GAPDH</i> (NG_007073)	5'-ACGTAGCTCAGGCCTCAAGACCTT-3' (FW)	60	321 bp
	5'-GCCGCATCACGTCCTCCGCCCCGCC-3' (RV)		

2.1.8 Bakterien, Zelllinien, humanes Tumor-Gewebe und Tiere

2.1.8.1 Bakterien

Für die Klonierung der lentiviralen Konstrukte wurden One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* (Genotyp F⁻*mcrB mrr hsdS20*(r_B⁻, m_B⁻) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Str^R) *xyl-5 λ⁻ leu mtl-1*; Invitrogen) verwendet. Dieser Bakterienstamm ist besonders geeignet, die Häufigkeit homologer Rekombinationen langer terminaler Sequenz-Wiederholungen in lentiviralen Vektoren zu verringern.

2.1.8.2 Zelllinien

Tab. 2.15: Humane Zelllinien und Herkunft.

Name	Herkunft
HEK293FT	Embryonale Niere
CHP-212	Neuroblastom
IMR-32	Neuroblastom

Kelly	Neuroblastom
LAN-1	Neuroblastom
SH-EP	Neuroblastom
SH-SY5Y	Neuroblastom
SK-N-AS	Neuroblastom
SK-N-BE(2)	Neuroblastom

HEK293FT Zellen wurden von JProf. Dr. Christoph Harms (Centrum für Schlaganfallforschung Berlin, Experimentelle Neurologie, Charité) zur Verfügung gestellt. Von den Neuroblastom-Zelllinien stammen die Kelly Zellen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (ACC 355) und SH-SY5Y sowie SK-N-AS Zellen von der *American Type Culture Collection* (CRL-2266 und CRL-2137). Alle weiteren Neuroblastom-Zelllinien wurden von PD Dr. Matthias Fischer (Abteilung Kinderonkologie und -hämatologie, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Kinderheilkunde der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.16: Medien, Medienzusätze und Chemikalien/Lösungen für Zellkulturen sowie deren Hersteller.

Produkt	Hersteller
all- <i>trans</i> Retinsäure	Sigma-Aldrich
DMEM mit stabilem Glutamin	Biochrom
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
L-Glutamin [200 mM]	Biochrom
MEM NEAA (mit nicht-essentiellen Aminosäuren)	PAA
Natriumpyruvat [100 mM]	Gibco
PBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Gibco
PEG- <i>it</i> TM Virus Precipitation Solution	System Biosciences

Penicillin/Streptomycin [10000 U/ml]/[10000 µg/ml]	Biochrom
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco
Trypan-Blau 0,5% (w/v) in PBS	Biochrom
Trypsin/EDTA [0,05%]/[0,02%]	Invitrogen
Trypsin-Neutralisationslösung (TNS)	Invitrogen

2.1.8.3 Humanes Neuroblastom-Gewebe

Kryoschnitte, RNA und Protein aus primären humanen Neuroblastomen wurden seitens der Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Kinderheilkunde der Universität zu Köln (Abteilung Kinderonkologie und -hämatologie), etabliert im Rahmen des Kompetenznetzes „Pädiatrische Onkologie und Hämatologie“, zur Verfügung gestellt. Die Proben stammten von Patienten, die in die Neuroblastom-Studien NB90-2004 eingeschlossen wurden; von allen Patienten war eine Einverständniserklärung eingeholt worden. Alle Tumorproben wurden vor zytotoxischer Behandlung entnommen und wiesen einen Tumorzell-Gehalt von mindestens 60% auf.

Für den Northern Blot (n = 14) wurden Proben folgender Stadien (Einteilung nach INSS) verwendet: Stadium 1: n = 4; Stadium 2: n = 3; Stadium 3: n = 3; Stadium 4: n = 3 und Stadium 4S: n = 1. Bei Diagnose waren 12 Patienten unter einem Jahr und 2 älter als ein Jahr alt. Eine genomische Amplifikation des *MYCN* Gens lag in einer der 14 Proben vor (analysiert durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung).

Für die Real-time PCR (n = 73) standen Proben mit folgenden klinischen Parametern zur Verfügung: Stadium 1: n = 12; Stadium 2: n = 9; Stadium 3: n = 9; Stadium 4: n = 34 und Stadium 4S: n = 9. Bei Diagnose waren 29 Patienten unter einem Jahr und 44 älter als ein Jahr alt. Eine genomische Amplifikation des *MYCN* Gens lag in 16 der 73 Proben vor.

Für die Microarray-Analysen wurden 251 Proben eingesetzt. Die Stadieneinteilung war wie folgt: Stadium 1: n = 69; Stadium 2: n = 44; Stadium 3: n = 40; Stadium 4: n = 67 und Stadium 4S: n = 31. Bei Diagnose waren 94 Patienten unter einem Jahr und 157 älter als ein Jahr alt. Eine genomische Amplifikation des *MYCN* Gens lag in 33 der 251 Proben vor. Entsprechend der Klassifizierung der Tumoren mit einem Genexpressions-basierten Klassifikator (Oberthuer et al., 2006) erfolgte eine Einteilung in 82 Hochrisiko- und 169 Niedrigrisiko-Tumoren.

2.1.8.4 Tiere

Die CD-1 Mäuse für immunhistochemische Analysen stammten von Charles River Laboratories. Die Genehmigung für die tierexperimentellen Arbeiten wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin erteilt (T 0152/05).

2.1.9 Sonstige Materialien

Tab. 2.17: Sonstige Materialien und Hersteller.

Produkt	Hersteller
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Autoradiographie Kassette	Fisher Scientific
Kodak BioMax MR-1 Filme	Amersham
Lab-Tek TM II Chamber Slide TM System	Nunc
Membranfilter Millex-HV (PVDF; Porengröße 0,45 µm)	Millipore
Nylon Membranen, positiv geladen	Roche
Protran [®] Nitrocellulose Transfermembran (0,2 µm)	Whatman
SuperFrost [®] Plus-Objektträger	Menzel-Gläser

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Extraktion von RNA und Quantifizierung

RNA aus humanem Neuroblastom-Gewebe wurde seitens der Tumorbank (s. 2.1.8.3) zur Verfügung gestellt. Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die RNA wurde mit 25 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer. Eine $OD_{260} = 1,0$ entsprach dabei einer Konzentration von 40 µg/ml RNA.

2.2.1.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erlaubt die Synthese der zu der mRNA komplementären DNA (*complementary DNA*/cDNA). Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA eingesetzt, welche mittels *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (M-MLV RT) und Oligo(dT)₁₅ Primern nach dem M-MLV RT Protokoll von Invitrogen umgeschrieben wurde. Als RNase Inhibitor wurde RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor von Promega verwendet. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*/PCR) dient der spezifischen Amplifizierung von DNA. Der Standard-Ansatz (25 µl) bestand für die Genexpressionsanalysen und die Amplifizierung genregulierender Sequenzen (am Ende des ChIP-Assays;

s. 2.2.6) aus 1x Green GoTaqTM Buffer, 5 nmol dNTPs, je 5 pmol der beiden Primer, 1,25 U GoTaqTM DNA Polymerase und 1-2 µl DNA. Für Klonierungen wurde ein PCR-Ansatz (50 µl) aus 1x Reaction Buffer with MgSO₄, 10 nmol dNTPs, je 20 pmol der beiden Primer, 2 µl DMSO und 2,5 U *Pfu* DNA Polymerase verwendet. Als Ausgangs-DNA diente hierbei entweder cDNA oder ein vorhandenes Expressionsplasmid (s. 2.2.1.5). Das PCR-Programm wurde im Mastercycler durchgeführt und bestand aus einem einmaligen Denaturierungsschritt bei 94°C für 2 min, anschließend variablen Zyklen (16-37) aus Denaturierung (94°C, 30 sec; bei Klonierungen 1 min), Annealing (T_A s. Tab. 2.9/2.12-2.14, 30 sec; bei Klonierungen 1 min) und Elongation (72°C). Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des Amplifikats. Bei der *Taq* Polymerase wurde 1 min pro 1 kb berechnet, bei der *Pfu* Polymerase 2 min pro 1 kb. Abschließend folgte ein Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. Die Proben wurden bis zur Gelelektrophorese bei 4°C gelagert.

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurde 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden pro 100 ml 5 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml] hinzugefügt. Die PCR-Produkte, die den Green GoTaqTM Buffer enthielten, konnten ohne weitere Behandlung aufgetragen werden. Die anderen Proben wurden zuvor mit Ladepuffer versetzt. Als Größenmarker wurden 0,7 µg des 1 Kb Plus DNA Ladders verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 10 V/cm Elektrodenabstand für 30-45 min. Unter UV-Licht wurde die DNA durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte am GeneFlash mit integrierter Kamera.

TAE-Puffer (1x): 40 mM Tris; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 8,0

Ladepuffer (10x): 0,02% (w/v) Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye; 50% (v/v) Glycerin

2.2.1.4 Real-time Polymerase-Kettenreaktion

Für quantitative Genexpressionsanalysen wurde eine Real-time PCR durchgeführt. Bei den Retinsäure-Experimenten erfolgte dies mit Hilfe der kommerziell erhältlichen TaqMan[®] Gene Expression Assays (s. Tab. 2.10) und dem TaqMan[®] Universal PCR Master Mix nach dem Protokoll des Herstellers (20 µl-Ansatz; Denaturierungsschritt auf 20 s verlängert) am iCycler iQ[™]. Serielle Verdünnungen der cDNA aus GATA-4 überexprimierenden SH-SY5Y Zellen dienten der Erstellung von Standardkurven, deren Berechnung mit Hilfe des Programms iCycler iQ[™] 3.1.7050 erfolgte. Angegeben wurden die relativen Expressionswerte im Verhältnis zu *β-Actin*.

Die Real-time PCR der cDNA aus humanem Neuroblastom-Gewebe wurde am ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System mittels SYBR[®] Green I durchgeführt. Der PCR-Ansatz (30 µl) bestand aus 26,8 µl 1x SYBR[®] Green PCR Master Mix, 0,4 µl cDNA (1:10-verdünnt) und je 3,5 pmol der Primer (s. Tab. 2.11). Für die Erstellung von Standardkurven wurden serielle Verdünnungen der cDNA aus IMR-32 Zellen verwendet. Das PCR-Programm umfasste einen einmaligen Inkubationsschritt bei 50°C für 2 min und nachfolgend 10 min bei 95°C sowie 40 Zyklen aus 95°C (15 sec) und 60°C (1 min). Für die Normalisierung der Daten wurden die Werte auf das geometrische Mittel der Expressionswerte der Gene *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT)* und *succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein (SDHA)* bezogen (Primersequenzen siehe (Fischer et al., 2005b)). Das geometrische Mittel dieser beiden Gene hat sich als interne Kontrolle beim Vergleich von Expressionswerten primärer Neuroblastome bewährt (Fischer et al., 2005b). Die Real-time PCR der cDNA aus humanem Neuroblastom-Gewebe wurde an der Universität zu Köln im Rahmen der Kooperation mit PD Dr. Matthias Fischer durchgeführt.

2.2.1.5 Klonierung lentiviraler Vektoren

Neuronale Zellen sind von allen Säugerzellen vermutlich die am schwersten zu transfizierenden Zellen (Biewenga et al., 1997). Daher wurde für die Überexpression die Infektion mittels Lentiviren gewählt. Der lentivirale Vektor pRRLSIN.cPPT.PGK/GFP.WPRE, der das Gen für *GFP* unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors enthält, wurde freundlicherweise von JProf. Dr. Christoph Harms zur Verfügung gestellt. Dieser diente als Kontrollvektor sowie als Ausgangsvektor für die Klonierungen der Expressionsplasmide für *GATA-4* und *FOG-2*. Die Gene für *GATA-4* bzw. *FOG-2* wurden anstelle von *GFP* (Schnittstellen *BamHI/SalI*) in den Vektor kloniert. Die Primer für die Amplifikation der kodierenden Sequenzen von *GATA-4* und *FOG-2* sind in Tab. 2.12 aufgelistet. Die Vorwärtsprimer enthielten die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BglII* (Überhänge kompatibel mit *BamHI*), die Rückwärtsprimer für *XhoI* (Überhänge kompatibel mit *SalI*). Da die kodierende Region von *FOG-2* bereits endogene Schnittstellen für sowohl *XhoI* als auch *BglII* aufwies, wurde *FOG-2* in zwei Teilen amplifiziert, wobei sich eine endogene *XbaI* Schnittstelle zunutze gemacht wurde. Diese befand sich im Rückwärtsprimer von Teil I und im Vorwärtsprimer von Teil II. Als Ausgangs-DNA für die Amplifikation von *GATA-4* diente cDNA aus SH-SY5Y Zellen. Für die Amplifikation von *FOG-2* wurde ein Expressionsvektor, der das Gen für humanes *FOG-2* enthält (erhalten von Dr. José Perdomo, St. George Hospital, University of New South Wales, Australien), verwendet. Zum Ablauf der PCR siehe 2.2.1.3. Die entsprechende Bande wurde anschließend aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und gereinigt (Elution in 25 µl H₂O).

Dann folgte der Restriktionsverdau von Vektor (*BamHI/SalI*) und DNA-Fragmenten (Inserts; *GATA-4*: *BglII/XhoI*; *FOG-2* Teil I: *BglII/XbaI*; *FOG-2* Teil II: *XbaI/XhoI*) in je einem 60 µl-Ansatz. Je nach DNA-Menge wurden 20-80 U pro Enzym eingesetzt und 3-4 h bei 37°C inkubiert. Um eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurde der Vektor dephosphoryliert. Dafür wurden zunächst bei 70°C für 20 min die Restriktionsenzyme deaktiviert. Die Dephosphorylierung erfolgte durch Zugabe von 1 U CIAP (pro 3 µg ge-

schnittenem Vektor) und einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 3 µl EDTA [250 mM] hinzugefügt und der Reaktionsansatz erhitzt (65°C, 15 min). Der geschnittene und dephosphorylierte Vektor wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und das Vektor-Fragment (das Gen für *GFP* wurde bei dem Restriktionsverdau herausgeschnitten) aus dem Gel extrahiert. Zur Reinigung der Insert-DNA wurde das QIAquick PCR Purification Kit nach den Herstellerangaben verwendet (Elution in 25 µl H₂O). Bis zur Ligation wurden sowohl Vektor als auch Insert bei -20°C gelagert.

Für die Ligation wurden in einem 10 µl-Ansatz je 1x DNA Ligase Reaction Buffer, 100 ng Vektor, Insert (in einem molaren Insert/Vektor-Verhältnis von 1/1) und 400 U (*GATA-4*) bzw. 2000 U (*FOG-2*) T4 DNA Ligase verwendet und 16 h bei 16°C inkubiert. Die Ligation beider Fragmente von *FOG-2* erfolgte in einem Schritt mit dem Vektor, wobei Fragment I in einem etwa sechsfachen molaren Überschuss zu Fragment II eingesetzt wurde. Die Ligationsansätze wurden bis zur Transformation bei 4°C gelagert.

Für die Transformation der Ligationsansätze (je 5 µl) wurden One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* nach den Angaben des Herstellers verwendet. Um die gesamte Menge der Bakterien ausstreichen zu können, wurden die Bakterien zum Schluss pelletiert (2300 g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in der übrigen Flüssigkeit resuspendiert. Dies wurde auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Um die Bakterien mit der Plasmid-DNA zu vermehren, wurden je 4 ml 2x LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin mit einer einzelnen Kolonie aus der Transformation angeimpft und in einem Schüttelbrutschrank bei 200 rpm und 37°C für 12-16 h inkubiert. Das 2x LB-Medium wurde verwendet, um eine höhere Ausbeute zu erreichen. Die Plasmid-DNA wurde aus 3 ml Bakterien-Kultur mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer. Eine $OD_{260} = 1,0$ entsprach dabei einer Konzentration von 50 µg/ml DNA.

Zur Kontrolle, ob das Plasmid das korrekte Insert enthielt, wurden je 500 ng Plasmid-DNA in einem 10 µl-Ansatz mittels Restriktionsendonukleasen verdaut. Dafür wurden 5-10 U je Enzym eingesetzt und das Reaktionsgemisch bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Restriktionsendonukleasen wurden so gewählt, dass sie das Plasmid in charakteristische Größen schnitten. Die Größen wurden auf einem Agarose-Gel überprüft. Die Plasmide wurden zur Validierung sequenziert (GATC Biotech).

Für die Präparation von Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab wurden 300 ml 2x LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) mit 1 ml der obigen Bakterien-Kultur angeimpft und bei 200 rpm und 37°C für 12-16 h inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (7400 g, 10 min, 4°C) und das Pellet anschließend in 7,5 ml GTE-Puffer resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurden 25 mg Lysozym (Inkubation 15 min bei RT) und nachfolgend 15 ml frisch hergestellter alkalischer SDS-Puffer (Inkubation 10 min auf Eis) hinzugefügt. Nach Neutralisation mit 11,25 ml 3 M Kaliumacetat (pH 4,8-5,2; Inkubation 10 min auf Eis) wurde bei 20200 g (30 min, 4°C) zentrifugiert und der Überstand auf 2 Röhrchen aufgeteilt. Zu jedem Röhrchen wurden 10 ml Isopropanol hinzugefügt, um die DNA zu fällen (Inkubation 10 min bei RT; Zentrifugation 3200 g, 25 min, 4°C). Die Pellets wurden in je 2 ml TE-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und die beiden gelösten Pellets des ursprünglich selben Ansatzes wieder vereint. 2,3 ml 8 M Ammoniumacetat wurden hinzugefügt, 1 h auf Eis inkubiert und bei 3200 g und 4°C für 25 min zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde anschließend mit 15 ml 100% Ethanol gefällt (Inkubation 15 min auf Eis; Zentrifugation 3200 g, 25 min, 4°C). Das Pellet wurde in 800 µl TE-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und die RNA durch Hinzufügen von 100 µg RNase A und einer Inkubation bei 37°C für 20 min abgebaut. Es folgte eine erneute Fällung der DNA durch Zugabe von 350 µl 5 M NaCl und 300 µl 30% (w/v) Polyethylenglykol (Inkubation 1 h auf Eis; Zentrifugation 20800 g, 25 min, 4°C). Zu dem Pellet wurden 450 µl TE-Puffer (pH 7,4) hinzuge-

fügt und über Nacht bei 4°C gelagert. Das Pellet wurde resuspendiert und 50 µl 5 M NaCl hinzugefügt. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dafür wurden 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und bei 20800 g für 15 min bei RT zentrifugiert. Die DNA-enhaltende wässrige obere Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Phenol:Chloroform (5:1) eine erneute Extraktion durchgeführt. Nun wurde die DNA mit 1 ml 100% Ethanol gefällt (Zentrifugation 20800 g, 30 min, 4°C) und anschließend mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und je nach Größe in 200-300 µl H₂O resuspendiert.

2x LB-Medium: 2% (w/v) Trypton/Pepton; 1% (w/v) Bacto™ Hefeextrakt; 170 mM Natriumchlorid; pH 7,3

LB-Agarplatten: 1x LB-Medium; 1,5% (w/v) Agar-Agar

GTE-Puffer: 50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA

Alkalischer SDS-Puffer: 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS

TE-Puffer: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4

2.2.1.6 Northern Blot

Für den Northern Blot wurde zunächst mit Hilfe des NorthernMax® Kits (Ambion) ein denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel (1% Agarose) entsprechend des Kit-Protokolls hergestellt. Für die Auftrennung der RNA wurden je 10 µg Gesamt-RNA aus humanem Neuroblastom-Gewebe eingesetzt. Der Gellauf, der Blot auf eine positiv geladene Nylon Membran sowie die Prähybridisierung erfolgten ebenfalls nach Herstellerangaben und mit den im Kit vorhandenen Puffern. Für die Synthese der spezifischen cDNA Sonden wurde zunächst eine PCR (Primer s. Tab. 2.9/2.13) durchgeführt und anschließend die DNA (etwa 25 ng) denaturiert. Unter Verwendung der *random priming* Methode (Hybridisierung mit

Zufallsdekameren, DNA-Synthese mittels Exonuklease-freiem Klenow-Fragment) und des Strip-EZ[®] DNA Kits (Ambion) wurden radioaktiv markierte [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATPs eingebaut. Für die Hybridisierung wurde die Membran mit den spezifischen Sonden im Prähybridisierungs-Puffer über Nacht bei 42°C inkubiert und anschließend nach den Angaben des NorthernMax[®] Kits gewaschen. Zur Detektion der Signale wurde der Membran ein Röntgenfilm (Kodak BioMax MR-1) in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie für 1,5 Stunden bis 3 Tage (je nach Signalintensität) bei -80°C exponiert. Die gebundenen Sonden wurden mittels des Strip-EZ[®] DNA Kits gespalten und entfernt, so dass dieselbe Membran nacheinander mit verschiedenen Sonden inkubiert werden konnte. Die Northern Blots wurden an der Universität zu Köln durchgeführt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

Alle Neuroblastom-Zelllinien wurden in sterilen Kulturflaschen bzw. -platten in RPMI 1640, dem 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% (v/v) FKS zugesetzt wurde, kultiviert. HEK293FT Zellen wurden in DMEM, dem 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% (v/v) FKS, 1% MEM NEAA und 1 mM L-Glutamin zugefügt wurde, kultiviert. Wenn im folgenden Medium genannt wird, ist stets das jeweilige Medium mit Zusätzen gemeint. Die Zellen wurden im CO₂-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle Zelllinien waren adhärent wachsend. Für die Zellpassage wurden die Zellen mit Ausnahme von IMR-32 Zellen mit vorgewärmtem (37°C) PBS gewaschen und etwa 20 µl Trypsin/EDTA pro cm² Wachstumsfläche hinzugefügt. Nach zwei- bis fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurde die Trypsinwirkung durch vorgewärmtes Medium gestoppt, und die Zellen konnten überführt werden. Bei Kelly Zellen war es nach der Inkubation mit Trypsin erforderlich, ein gleiches Volumen an TNS hinzuzufügen. IMR-32 Zellen konnten ohne Trypsinieren und lediglich durch Pipettieren abgelöst werden.

2.2.2.2 Kryopreservation und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von Zellen sollte langsam erfolgen und mit einer definierten Zeitkinetik von 1°C/min. Zudem ist der Einsatz des Gefrierschutzmittels DMSO entscheidend, da es die Bildung von Eiskristallen verhindert. Die Zellen sollten eine Konfluenz von 70-80% aufweisen. Nach Trypsinieren und Aufnahme in Medium wurden die Zellen zentrifugiert (200 g, 2 min, RT) und je nach Größe des Pellets in 1-4 ml Einfriermedium (Medium plus zusätzlich 10% FKS und 10% DMSO) resuspendiert. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und sofort in eine Einfrierbox gesetzt. Die Einfrierbox war für die Gewährleistung der konstanten Einfrierkinetik mit Isopropanol befüllt und wurde mit den Röhrchen einen Tag bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zur langfristigen Lagerung in den Flüssigstickstofftank (-196°C) überführt.

Das Auftauen der Zellen sollte schnell erfolgen. Das Kryoröhrchen wurde in ein Wasserbad (37°C) gehalten und nach kurzem Antauen mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert. Durch tropfenweises Zugabe von 1 ml warmem Medium wurden die Zellen vollständig aufgetaut und vorsichtig mit einer Pipette aufgesogen. Da DMSO auch zelltoxisch wirkt, wurden die Zellen anschließend mit Medium gewaschen, bevor sie je nach Kulturflasche bzw. -platte in einem geeigneten Volumen Medium aufgenommen wurden.

2.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Zellen mit einem gleichen Volumen Trypan-Blau-Lösung versetzt und 10 µl in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Durch die Trypan-Blau-Lösung wurden tote Zellen angefärbt, so dass sie von lebenden Zellen unterschieden werden konnten. Die Zellzahl ergab sich aus folgender Formel: Zellen/ml = Mittelwert der 4 großen Eckquadrate $\times 10^4 \times 2$.

Für die Bestimmung der Zellzahl nach Überexpression von GATA-4 und/oder FOG-2 wurde entweder ein XTT-Assay durchgeführt oder die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

ermittelt. Für den XTT-Assay wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT; Roche) verwendet. Dieser Test beruht darauf, dass das Tetrazoliumsalz XTT (Natrium 3'-[1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium]-bis-(4-Methoxy-6-Nitro)-Benzen-Sulfonsäurehydrat) in den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert wird, welches photometrisch bei einer Wellenlänge zwischen 450 und 500 nm (Referenzwellenlänge über 650 nm) bestimmt werden kann. Die Absorption korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen. In einer 96-Well-Platte wurden je 400 (CHP-212), 200 (SH-EP), 5000 (SH-SY5Y) bzw. 1000 (SK-N-AS) Zellen ausgesät. Dies erfolgte für CHP-212 und SH-EP Zellen zwei Tage, für SH-SY5Y und SK-N-AS Zellen einen Tag vor Virenzugabe. Dann wurden die Viren hinzugefügt (GFP als Kontrolle, GATA-4, FOG-2; pro Bedingung drei Wells) und am nächsten Tag durch frisches Medium ersetzt. Am Tag (d) 4, d7 und d11 (nach Virenzugabe) wurde der Assay nach den Herstellerangaben und mit der üblichen Hintergrundkontrolle (reines Medium ohne Zellen) durchgeführt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) stets 4, 7 und 23 h nach Substratzugabe. Für die Auswertung wurde der jeweils optimale Zeitpunkt (OD zwischen 0,1 und 1,0) ausgewählt.

Der Assay für die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer wurde im 24-Well-Format durchgeführt. Je 30.000 (SH-SY5Y) bzw. 1000 (SH-EP) Zellen wurden ausgesät, bevor am nächsten Tag Viren (GFP als Kontrolle, GATA-4, GATA-4 + FOG-2) hinzugefügt wurden. Am darauffolgenden Tag wurde das virenhaltige Medium durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden an d4, d7 und d11 geerntet; es wurden lebende und tote Zellen gezählt.

Trypan-Blau-Lösung: 0,16% (w/v) Trypan-Blau in PBS

2.2.2.4 Lentivirenproduktion

Für die Produktion von Lentiviren wurden neben dem lentiviralen Expressionsvektor pRRLSIN.cPPT.PGK/x.WPRE (x steht für *GFP* oder das stattdessen eingebrachte Gen; s. 2.2.1.5) das Plasmid psPAX2 (Verpackungsplasmid der zweiten Generation) und das Hüllplasmid pMD2.G verwendet (Follenzi et al., 2000; Zufferey et al., 1997). Alle Plasmide wurden freundlicherweise von JProf. Dr. Christoph Harms zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden pro Ansatz 6×10^6 HEK293FT Zellen in einer T175 Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Medium, dem zusätzlich 1 mM Natriumpyruvat zugesetzt wurde, ersetzt; die Zellen wurden mit 17,5 µg des Expressionsplasmides, 12,5 µg psPAX2 und 7,5 µg pMD2.G unter Verwendung des CalPhosTM Mammalian Transfection Kits (Clontech) transfiziert. Einen Tag später erfolgte ein Mediumwechsel. An den beiden darauffolgenden Tagen wurde jeweils der Zellkulturüberstand mit den lentiviralen Partikeln abgenommen, gesammelt und bei 4100 g für 15 min (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen PVDF Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) von Zellfragmenten befreit und anschließend mittels PEG-*it*TM Virus Precipitation Solution nach Herstellerangaben etwa 100-fach konzentriert. Die konzentrierte Viruslösung wurde in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 Lentivirale Transduktion

Um Zellen mit Virus zu transduzieren, wurde eine je nach Zelllinie variierende Zellzahl ausgesät und am nächsten Tag nach frischer Mediumzugabe Virus hinzugefügt. Nach 16 h wurde das virenhaltige Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach frühestens drei weiteren Tagen wurden die Zellen geerntet. Die Transduktionseffizienz konnte in den GFP-Kontrollen am Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

Für jeden Ansatz wurde die optimale GFP-Kontrolle experimentell ermittelt. Dafür wurde sich zunutze gemacht, dass der Expressionsvektor pRRLSIN.cPPT.PGK/x.WPRE direkt

nach dem Stop-Codon des Transgens das *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (WPRE) enthält. Dies wird bei der Virusinfektion zusammen mit dem Transgen und unabhängig von dessen spezifischer cDNA-Sequenz in das Genom der infizierten Zelle integriert. WPRE wird bei der Transkription des Transgens Teil der 3'-untranslatierten Region (UTR). Es ist in den Vektor eingefügt worden, da es die Expression des Transgens verstärkt (Zufferey et al., 1999). So kann über die quantitative Bestimmung von *WPRE* für jeden Ansatz die Kontrolle ermittelt werden, bei der in etwa gleiche Mengen viraler DNA in das Genom der Zielzelle integriert wurden. Nimmt man cDNA für diese Analyse, so quantifiziert man die Expressionshöhe des Transgens unabhängig vom Transgen selbst und kann so Probe und Kontrolle vergleichen (Lizée et al., 2003). Zugleich nutzt man den Vorteil, dass lediglich eine PCR für *WPRE* erforderlich ist; die Quantifizierung der Integration von Probe und Kontrolle erfolgt somit mit der gleichen PCR-Effizienz. Da *WPRE* im humanen Genom nicht vorhanden ist, wird zudem ausschließlich die ektope Expression des Transgens (unabhängig von dessen endogener Expression) quantifiziert. Für die Transduktion der Neuroblastomzellen wurden verschiedene Virusvolumina verwendet, beispielsweise ein Bereich zwischen 1 und 25 µl pro Well einer 24-Well-Platte. Nach dem Ernten wurde von der cDNA eine PCR für *WPRE* durchgeführt; anhand der Bandenstärken konnte für jede Probe die geeignete GFP-Kontrolle ausgewählt werden.

2.2.2.6 Behandlung der Zellen mit all-trans Retinsäure

Die Zellen wurden über acht Tage mit 10 µM all-trans Retinsäure behandelt. Dafür wurden in einer 6-Well-Platte pro Well 750000 (SH-SY5Y) bzw. 5000 (SH-EP) Zellen ausgesät und im Dunkeln ATRA hinzugefügt (Stock-Lösung 50 mM in DMSO; 1:5000 verdünnt). Als Kontrolle dienten jeweils gleiche Volumina an DMSO. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischer ATRA. An d2, d4, d6 und d8 wurden die Zellen geerntet und gezählt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion und -quantifizierung

Die Zellen wurden trypsiniert, zentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (800 g, 8 min, 4°C). Das Pellet wurde in RIPA-Puffer (5x Volumen des Pellets) gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Zellfragmente wurden bei 20000 g (10 min, 4°C) entfernt, das Lysat aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alternativ wurden Zellen direkt aus Wells extrahiert. Dafür wurden die Zellen mit kaltem PBS gespült und auf Eis mit RIPA-Puffer und einem Zellschaber abgelöst. Das weitere Procedere entsprach dem oben beschriebenen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Bradford-Methode verwendet. Aus BSA wurde eine Standardreihe erstellt und Proben und Standards nach Herstellerangaben mit dem Protein Assay Dye Reagent Concentrate versetzt und am Photometer vermessen.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% (v/v) Igepal CA-630; 0,25% (w/v) Natriumdeoxycholat; 0,1% (w/v) SDS; frisch hinzufügen: pro 1 ml RIPA-Puffer 143 µl 7x Complete Protease-Inhibitoren

Complete Protease-Inhibitoren (7x): 1 Tablette Complete Mini gelöst in 1,5 ml H₂O

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinlysate (äquivalente Mengen; 50-65 µg) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Je nach gewünschtem Trennbereich der Proteine wurden die Lysate auf ein 10% oder 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Tab. 2.18). Als Molekulargewichtsstandard wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard (10 µl) verwendet. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V für 20 min und anschließend 120 V für 1-1,5 h durchgeführt.

Tab. 2.18: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen. Herstellung von zwei 0,75 mm dicken Mini-gelen.

	Acrylamidkonzentration		
	10% Trenngel	15% Trenngel	3,6% Sammelgel
Millipore-Wasser	4 ml	2,3 ml	2,25 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	---	950 µl
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	3,3 ml	5 ml	450 µl
10% (w/v) SDS	100 µl	100 µl	38 µl
25% (w/v) APS	40 µl	40 µl	15 µl
TEMED	10 µl	10 µl	8 µl

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8

Sammelgelpuffer: 500 mM Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8

SDS-Probenpuffer (4x): 250 mM Tris pH 6,8; 40% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) β-Mercaptoethanol; 8% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye

Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

2.2.3.3 Western Blot

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mit dem *Semi-Dry* Verfahren. Gel, Filterpapiere und Membran wurden in Blotpuffer äquilibriert und nach Herstellerangaben für den *Semi-Dry* Elektrobloetter angeordnet. Der Transfer wurde für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA/cm^2 Membran durchgeführt und mittels

Ponceaurot-Färbung (5 min; Entfärben mit H₂O) überprüft. Unbesetzte Proteinbindungsstellen wurden mit 5% (w/v) Milchpulver in TBST für 1 h bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (s. Tab. 2.6) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min wurde der HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper (s. Tab. 2.7) hinzugefügt, 2 h bei RT (bzw. 45 min bei β -Actin) inkubiert und nochmals dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgte durch eine chemilumineszente Reaktion mittels ECL Detection Reagents nach den Angaben des Herstellers. Zur Visualisierung der Signale wurde der Membran ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL) für 10 sec bis 45 min (je nach Signalintensität) exponiert.

Blotpuffer: 48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,04% SDS

Ponceaurot: 5% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Ponceau S

TBS: 30 mM Tris HCl; 150 mM NaCl; pH 7,6

TBST: TBS; 0,1% (v/v) Tween[®] 20

2.2.4 Histochemische und histologische Methoden

2.2.4.1 Immunhistochemie

Wildtyp CD-1 Mäuse wurden terminiert verpaart. Der Morgen, an dem bei dem Weibchen ein vaginaler Schleimpfropf festgestellt wurde, wurde als E0,5 festgesetzt. Der Tod der trächtigen Maus wurde am gewünschten Entwicklungstag der Embryonen durch zervikale Translokation herbeigeführt, bevor die Embryonen entnommen wurden. Anhand morphologischer Kriterien (Kaufmann, 2004) wurde das korrekte Gestationsalter bestätigt. Die Embryonen wurden in kaltem 4% PFA/PBS für 1 h (E9,5), 1,5 h (E10,5), 2 h (E11,5), 2-3 h (E12,5-E13,5) bzw. über Nacht (ab E14,5) fixiert. Embryonen ab E16,5 und Jungtiere wurden zusätzlich und vor der über Nacht-Fixierung transkardial perfundiert, damit die Fixie-

runungslösung besser eindringen konnte. Dies erfolgte unter letaler Anästhesie (200 mg/kg Ketamin und 40 mg/kg Rompun[®]; intraperitoneal). Anschließend wurde das Gewebe für die Kryoprotektion in 20% (w/v) Saccharose/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in Cryo-M-Bed eingebettet; am Kryostat wurden bei -20°C 14 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf SuperFrost[®] Plus-Objektträger überführt, 1 h bei 37°C getrocknet und bei -80°C gelagert. Für die Immundetektion wurden die Schnitte mit PBST gewaschen und mit Blocklösung 1 h bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (s. Tab. 2.6) erfolgte bei 4°C über Nacht. Bei den Negativkontrollen wurde statt mit primärem Antikörper lediglich mit Blocklösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) wurde erneut Blocklösung (Inkubation 30 min, RT) und anschließend der sekundäre Antikörper (s. Tab. 2.7; Inkubation 2 h bei RT) hinzugefügt. Schließlich wurde nach nochmaligem Waschen die DAPI-Färbung durchgeführt (0,2 mg/ml in PBST für 5 min). Die Schnitte wurden in PBST eingedeckelt und das Deckgläschen mit Nagellack fixiert.

Die SH-SY5Y Zellen wurden auf Glas-Objektträgern mit abnehmbaren Plastik-Wells (Lab-Tek[™] II Chamber Slides[™]) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit kaltem 4% PFA/PBS fixiert (10 min, RT) und anschließend dreimal mit PBST gewaschen (je 10 min). Die Permeabilisierung und Färbung erfolgte wie für die Maus-Gewebeschnitte beschrieben. Neuroblastom-Gewebeschnitte (Schnittdicke 5-6 µm) wurden analog zu den Zellen fixiert und gefärbt.

Blocklösung für IHC: PBS; 10% (v/v) FKS; 0,1% (w/v) BSA Fraction V; 0,1% (v/v) Triton[®] X-100; 0,05% (w/v) Natriumazid

PBST: PBS; 0,1% (v/v) Triton[®] X-100

2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Neuroblastom-Gewebeschnitten wurde an der Universität zu Köln nach einem Routineprotokoll durchgeführt.

2.2.4.3 Bildaufnahme und Bildbearbeitung

Für die Mikroskopie von Schnitten oder Zellen auf Objektträgern wurde das Axioplan 2 imaging Mehrkanal-Fluoreszenzmikroskop, für die Mikroskopie von Zellen in Zellkulturplatten das inverse Mikroskop Axiovert 40 CFL verwendet. Mit dem inversen Mikroskop ist sowohl Durchlicht- als auch Fluoreszenzmikroskopie (GFP) möglich. Die Bilder wurden mit der Digitalkamera AxioCAM MRc und dem Programm AxioVision 4.2 aufgenommen. Für die Bilder der Negativ-Kontrollen wurden die gleichen Belichtungszeiten wie für positive Präparate eingestellt. Die Fotos wurden mittels Adobe® Photoshop® CS3 Extended digital bearbeitet; Positiv- und Negativ-Paare wurden stets exakt gleich behandelt.

2.2.5 Expressionsanalyse mittels Microarray

Die 11K Oligonukleotid-Microarrays waren eigens für die Genexpressionsanalyse von Neuroblastomen entwickelt und von Agilent Technologies angefertigt worden (Oberthuer et al., 2006). Von jeder Probe wurde aus 1 µg Gesamt-RNA nach den Herstellerangaben Cy3- oder Cy5-markierte *antisense* cRNA synthetisiert (Low RNA Input Linear Amplification Kit; Agilent). Diese wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) und den von Agilent empfohlenen Modifizierungen aufgereinigt. Für die Zwei-Farben (Cy3/Cy5)-Hybridisierung wurden unterschiedlich markierte cRNAs der Probe und einer Referenz-RNA (RNA-Gemisch von 100 verschiedenen Neuroblastom-Proben) verwendet. Auf einem Slide waren zwei 11K-Arrays vorhanden; so konnte jede Probe im Duplikat (mit

Farbstoff-Wechsel) vermessen werden. Je 0,5 µg der beiden cRNAs wurden gemischt und auf 95 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 25 µl 10x Control Targets und 5 µl 25x Fragmentation Buffer (*In Situ* Hybridization Kit Plus, Agilent) hinzugefügt. Nach Vortexen erfolgte eine Inkubation bei 60°C für 30 min, bevor mit 125 µl 2x Hybridization Buffer (ebenfalls *In Situ* Hybridization Kit Plus) abgeschlossen wurde. 220 µl wurden für den Array verwendet. Die Hybridisierung (60°C, 17 h), das Waschen und das Scannen der Arrays erfolgte nach dem von Agilent empfohlenen Ablauf. Die Prozessierung und die Qualitätskontrolle der Rohdaten sowie die Normalisierung der Expressionsprofile wurden wie beschrieben durchgeführt (Oberthuer et al., 2006). Die Werte der mit dem Farbstoff-Wechsel vermessenen Duplikate wurden gemittelt. Die Microarray-Analysen wurden an der Universität zu Köln durchgeführt.

2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitations-Assay

Der Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP)-Assay dient dem *in vivo* Nachweis der Bindung von Proteinen an DNA und wurde mit Hilfe des ChIP Assay Kits von Millipore durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5×10^6 SH-SY5Y Zellen trypsinisiert und für die Quervernetzung der Proteine an die DNA mit 1% Formaldehyd versetzt (Inkubation 37°C, 10 min). Die Zellen wurden nach Herstellerangaben gewaschen und lysiert. Anschließend wurde die DNA durch Ultraschallbehandlung in 300-500 bp große Fragmente geschert. Die Inkubation mit den Antikörpern (je 10 µg; s. Tab. 2.6) erfolgte über Nacht bei 4°C. Ein Ansatz wurde für die Negativ-Kontrolle ohne Antikörper inkubiert. Dann wurden die Antikörper-Protein-DNA-Komplexe mittels Protein A-Agarose und Zentrifugation präzipitiert. Der Überstand wurde mit Ausnahme des Überstandes nach Inkubation ohne Antikörper (= Input DNA) verworfen. Es folgten mehrere Waschschrte nach den Angaben des Protokolls von Millipore. Nach Auflösen der Immunkomplexe sowie der Protein-DNA-Quervernetzung wurden die Proteine mittels 40 µg/ml Proteinase K (45°C, 1 h) abgebaut und die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt (Elution mit

30 µl Puffer EB). Die gereinigte DNA wurde dann für die PCR zur Amplifizierung regulierender Sequenzen des jeweiligen Zielgens verwendet (je 2 µl).

2.2.7 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde das Programm PASW[®] Statistics verwendet. Die Real-time PCR- und Microarray-Analysen der humanen Neuroblastom-Proben wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test ausgewertet. Die Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden mittels Student's t-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Ein *p*-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die statistische Auswertung der Microarray-Analysen der SH-SY5Y Zellen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und wurde an der Universität zu Köln durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 im humanen Neuroblastom im Vergleich zum sich entwickelnden Nervensystem der Maus

3.1.1 Die Expression von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 im humanen Neuroblastom

Zunächst wurde mittels Immunhistochemie die Expression von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 in primärem humanem Neuroblastom-Gewebe untersucht. Alle vier Proteine konnten im Zellkern nachgewiesen werden, wie die Überlagerung der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI zeigte (Abb. 3.1). Die HE-Färbung wurde von einem angrenzenden Gewebeschnitt des jeweils selben Tumors durchgeführt, um die Qualität der Schnitte zu überprüfen und die Morphologie darzustellen.

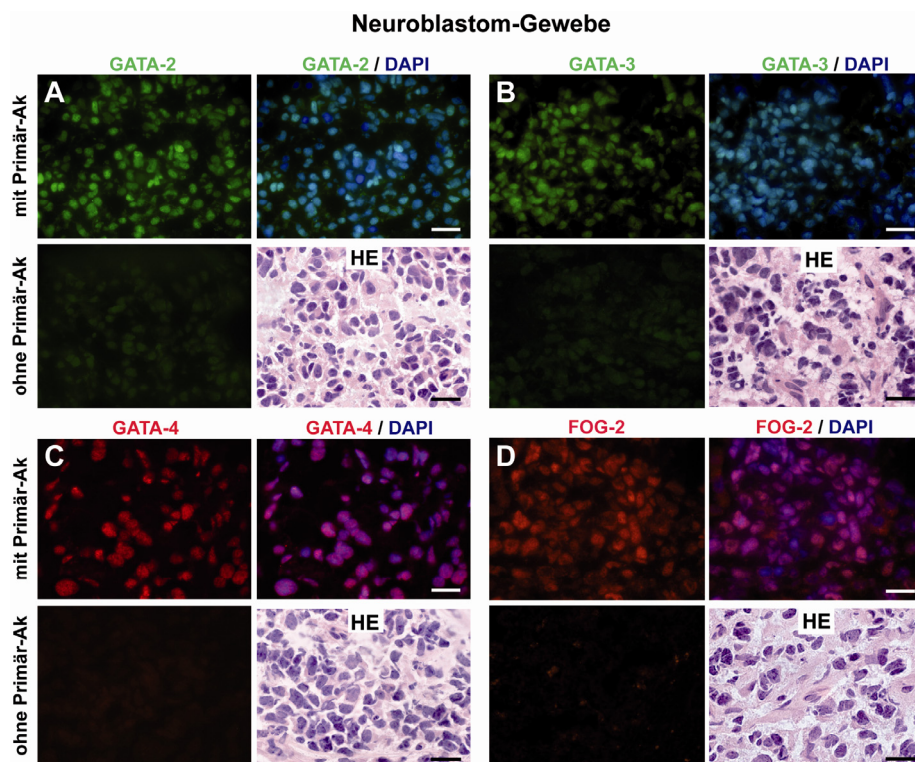


Abb. 3.1: Immunhistochemischer Nachweis von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 in primärem humanem Neuroblastom-Gewebe. (A) GATA-2, (B) GATA-3, (C) GATA-4 und (D) FOG-2. Oben links jeweils mit Primär-Antikörper, darunter die Negativ-Kontrolle ohne Primär-Antikörper. Oben rechts die Doppelfärbung mit DAPI, darunter die HE-Färbung. Balken entsprechen 20 µm.

Analog dazu wurden in einer humanen Neuroblastom-Zelllinie (SH-SY5Y) GATA-2, -3, -4 und FOG-2 angefärbt. Auch hier zeigte sich für alle Faktoren eine nukleäre Lokalisation (Abb. 3.2).

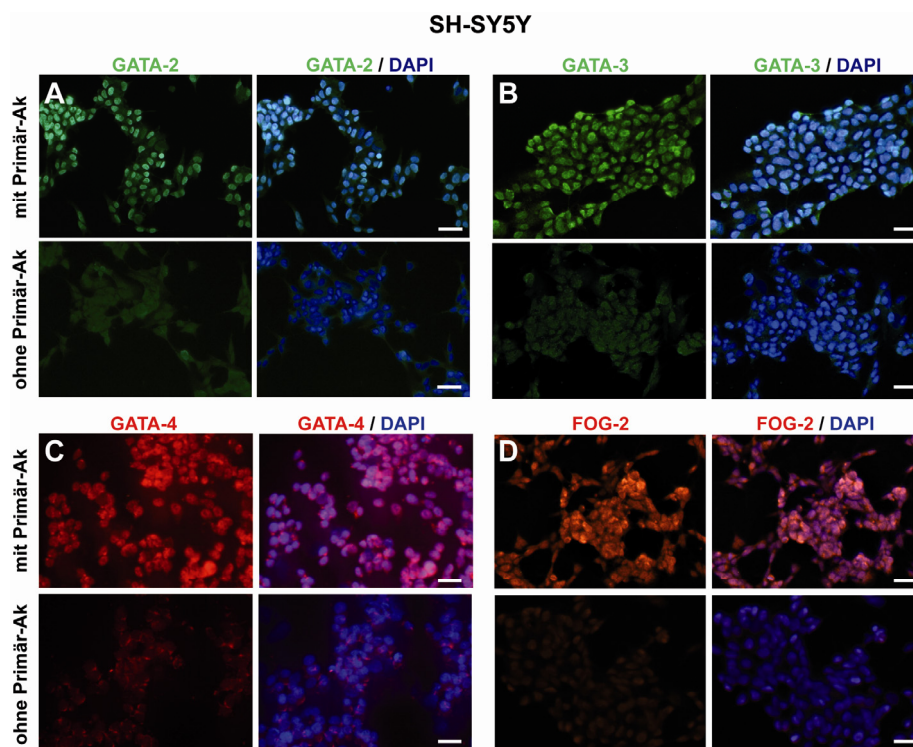


Abb. 3.2: Immunhistochemischer Nachweis von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y. (A) GATA-2, (B) GATA-3, (C) GATA-4 und (D) FOG-2. Oben jeweils mit Primär-Antikörper, darunter die Negativ-Kontrolle ohne Primär-Antikörper. Rechts die Doppelfärbung mit DAPI. Balken entsprechen 50 µm.

3.1.2 Die Expression von Gata-4 und Fog-2 im sich entwickelnden Nervensystem der Maus

Die Expression und Rolle von GATA-2 und -3 für die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems ist beschrieben worden (Lim et al., 2000; Nardelli et al., 1999; Pandolfi et al., 1995; Tsarovina et al., 2004; Zhou et al., 2000), die Rolle von GATA-4 jedoch war bislang unklar. Daher wurde eine ausführliche immunhistochemische Analyse hinsichtlich der Expression von Gata-4 im sich entwickelnden murinen Gehirn und sympa-

thischen Nervensystem durchgeführt. An E9,5 (Abb. 3.3; links) konnte Gata-4 weder in Neuralleistenzellen, die vom sich schließenden Neuralrohr wandern, noch in der Chorda dorsalis oder dem Neuralrohr selbst detektiert werden. Zudem waren auch Spinalganglien und das Rückenmark Gata-4-negativ. Die Region des Hinterhirns einschließlich des akustikofazialen (VII-VIII) Neuralleistekomplexes zeigte genauso wie der Pons und das trigeminale (V) Neuralleisten-Gewebe keine Gata-4 Expression. An E11,5 (Abb. 3.3; rechts) konnte Gata-4 ebenfalls nicht in Strukturen des zentralen und peripheren Nervensystems detektiert werden. So waren sowohl Rückenmark und Spinalganglien als auch Grenzstrang und sympathische Ganglien Gata-4-negativ. Auch im ventralen Thalamus und Ganglion trigeminale wurde kein Gata-4 nachgewiesen. Das Herz (Myokard) diente hierbei als Positiv-Kontrolle; hier ist deutlich eine nukleäre Färbung zu sehen. β -Tubulin wurde angefärbt, um unreife Neuronen zu kennzeichnen. Zusätzlich wurden Strukturen des sympathischen Nervensystems an E17,5 und das Gehirn an E11,5-E18,5 und Postnataltag (P) 4,5-P8,5 und das adulte Gehirn untersucht; in keinem Fall konnte Gata-4 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Gata-4 wird offensichtlich weder im sich entwickelnden zentralen oder peripheren Nervensystem noch im postnatalen und adulten Gehirn der Maus exprimiert.

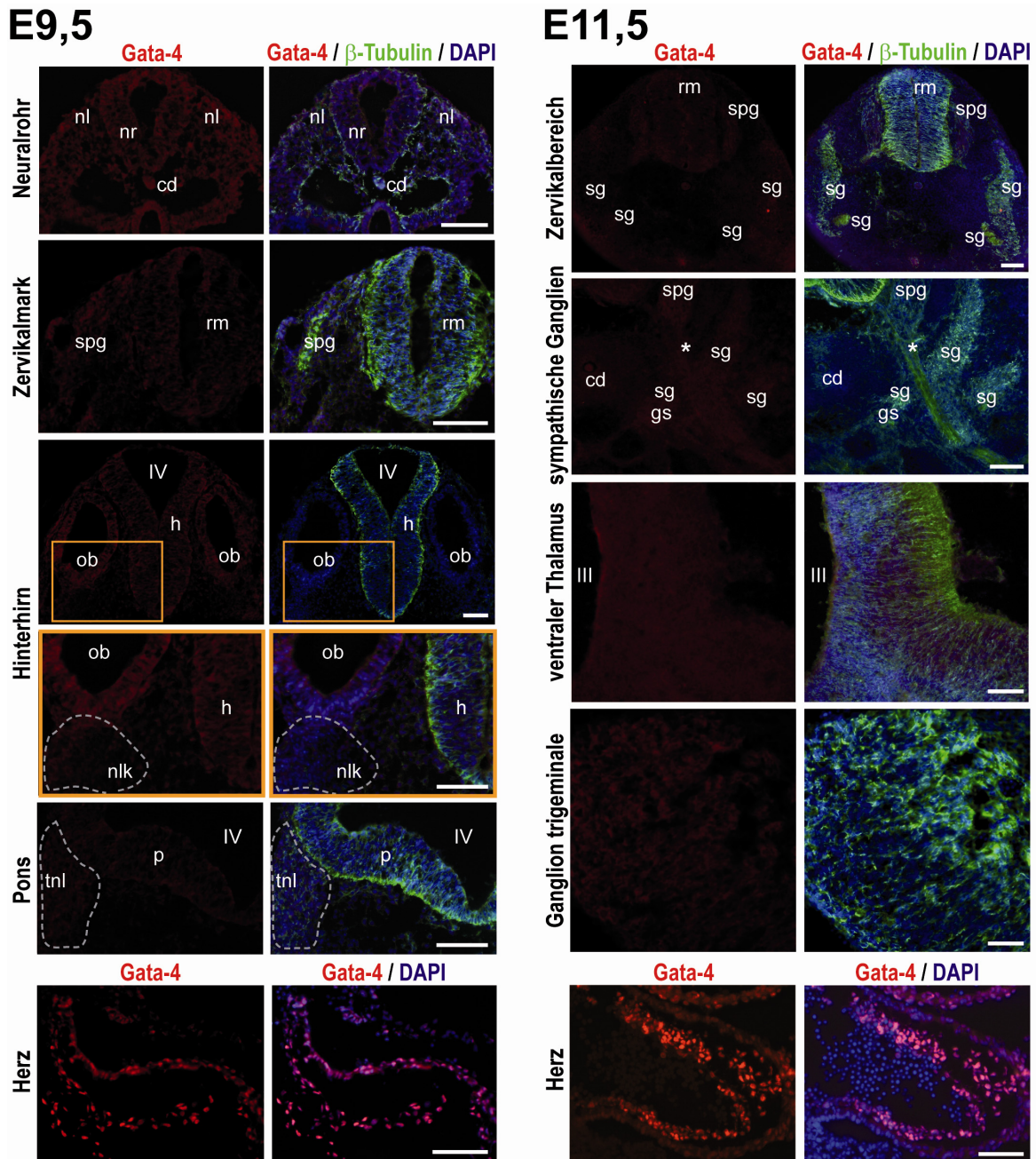


Abb. 3.3: Immunhistochemische Analyse der Gata-4 Expression im murinen Gehirn, sympathischen Nervensystem und Herzen. Links von oben nach unten: Einzelfärbung für Gata-4 bzw. Dreifachfärbung für Gata-4, β-Tubulin und DAPI an E9,5 mit dem sich schließenden Neuralrohr, dem Zervikalmark, Hinterhirn und dem Pons. Rechts von oben nach unten: dieselben Färbungen an E11,5 für den Zervikalbereich, sympathische Ganglien, den ventralen Thalamus und das Ganglion trigeminale. Das Herz diente als Positiv-Kontrolle. Die orangen Rahmen stellen vergrößerte Ausschnitte der darüber liegenden Abbildungen dar. III = dritter Ventrikel; IV = vierter Ventrikel; cd = Chorda dorsalis; gs = Grenzstrang; h = Hinterhirn; nl = Neuralleiste; nlk = akustikofazialer (VII-VIII) Neuralleistenkomplex; nr = Neuralrohr; ob = Ohrbläschen; p = Pons; rm = Rückenmark; sg = sympathisches Ganglion; spg = Spinalganglion; tnl = trigeminales (V) Neuralleisten-Gewebe; * = Radix ventralis. Balken entsprechen 100 μm.

Da FOG-2 ein wichtiger Kofaktor für GATA-4 ist, wurde dessen Expression ebenfalls im sich entwickelnden Nervensystem mittels Immunhistochemie untersucht. Die Expression im sich entwickelnden und adulten Gehirn der Maus ist bereits beschrieben worden (Lu et al., 1999; Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999), daher wurde sich hier auf das periphere Nervensystem konzentriert, insbesondere auf sympathische Strukturen als Ursprungsort des Neuroblastoms. Am Entwicklungstag 10,5 konnte Fog-2 im ventralen Rückenmark und in wandernden Neuralleistenzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.4 A-B). Spinal- und sympathische Ganglien waren jedoch Fog-2-negativ (Abb. 3.4 A, C). Im medialen Teil des akustikofazialen Ganglions konnte Fog-2 wiederum detektiert werden (Abb. 3.4 D). An E11,5 wurde sowohl die Expression von Fog-2 in wandernden Neuralleistenzellen als auch die fehlende Expression in Spinalganglien bestätigt (nicht gezeigt). Auch an E13,5 wurde Fog-2 in Spinal- und sympathischen Ganglien nicht exprimiert, es fand sich jedoch wie bereits an E10,5 eine Färbung im Rückenmark (Abb. 3.4 E-F).

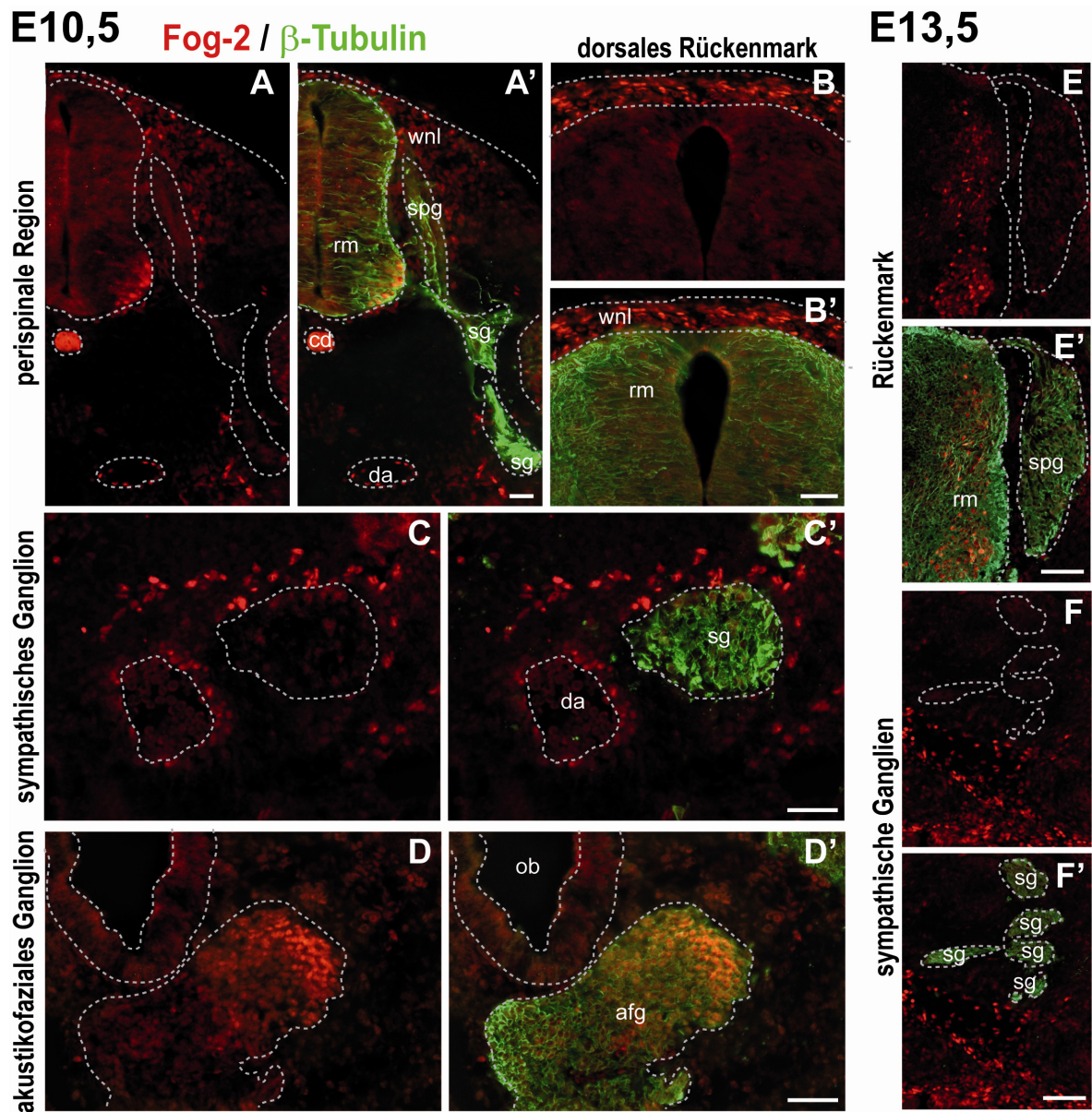


Abb. 3.4: Immunhistochemische Analyse der Fog-2 Expression im murinen Nervensystem. (A-D) E10,5 und (E-F) E13,5. Jede Abbildung ist als Einzel- und Doppelfärbung dargestellt: (A-F) Fog-2, (A'-F') Doppelfärbung von Fog-2 und β -Tubulin, um neuronale Zellen zu markieren. (A, A') perispinale Region, (B, B') dorsales Rückenmark, (C, C') sympathisches Ganglion, (D, D') akustikofaziales Ganglion, (E, E') Rückenmark und (F, F') sympathische Ganglien. afg = akustikofaziales Ganglion; cd = Chorda dorsalis; da = dorsale Aorta; ob = Ohrbläschen; rm = Rückenmark; sg = sympathisches Ganglion; spg = Spinalganglion; wnl = wandernde Neuralleistenzellen. Balken entsprechen 100 μ m.

3.1.3 Unterschiedliche Expressionsstärken von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 in verschiedenen Neuroblastom-Subtypen

Da alle vier untersuchten Proteine im Neuroblastom nachgewiesen wurden (s. 3.1.1), wurden nachfolgend deren Expressionsstärken in verschiedenen Neuroblastom-Subtypen verglichen. In ersten Untersuchungen wurde eine konventionelle PCR-Analyse von cDNA aus humanen Neuroblastom-Proben vier verschiedener Patienten durchgeführt (Abb. 3.5). Bei diesen zeigte sich ein auffälliger Unterschied zwischen den Expressionsstärken für *GATA-2*, -3 und *FOG-2* einerseits sowie für *GATA-4* andererseits. So wiesen *GATA-2* und *FOG-2* ein praktisch identisches Expressionsmuster auf mit einer geringen Expression in #3 und #4 und einer höheren Expression in #1 und #2. Während *GATA-3* in einem ähnlichen Verhältnis exprimiert wurde, zeigte sich für *GATA-4* ein deutlich anderes Bild. *GATA-4* wurde am höchsten bei #3 exprimiert, gefolgt von #4 und wies bei #1 und #2 eine sehr geringe Expressionsstärke auf. Daher stellte sich die Frage, ob sich dieses Muster auch bei einer höheren Anzahl von Neuroblastom-Proben bestätigen und ob die Expressionsstärke abhängig vom Subtyp des Neuroblastoms sein würde.

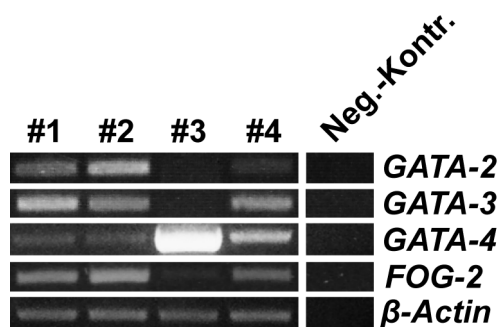


Abb. 3.5: PCR-Analyse für *GATA-2*, -3, -4 und *FOG-2* von humaner Neuroblastom-cDNA. #1 - #4 repräsentieren Neuroblastom-Proben vier verschiedener Patienten. *β -Actin* diene als Ladekontrolle. Neg.-Kontr. = Negativ-Kontrolle mit H₂O statt cDNA. Zyklen: *GATA-2* und *GATA-3* = 22, *GATA-4* = 34, *FOG-2* = 26, *β -Actin* = 17.

Um eine quantitative Analyse der Expressionsstärken durchzuführen, wurde zunächst für *GATA-2*, *GATA-3* und *FOG-2* ein Northern Blot von 14 verschiedenen Neuroblastom-

Proben unterschiedlicher Tumorstadien durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine ähnliche Expressionsstärke für alle drei Faktoren in den Tumoren der lokalisierten Stadien und des Stadiums 4S (n = 11), jedoch eine auffällig reduzierte Expression in den Tumorproben des prognostisch ungünstigen Stadiums 4 (n = 3) (Abb. 3.6).

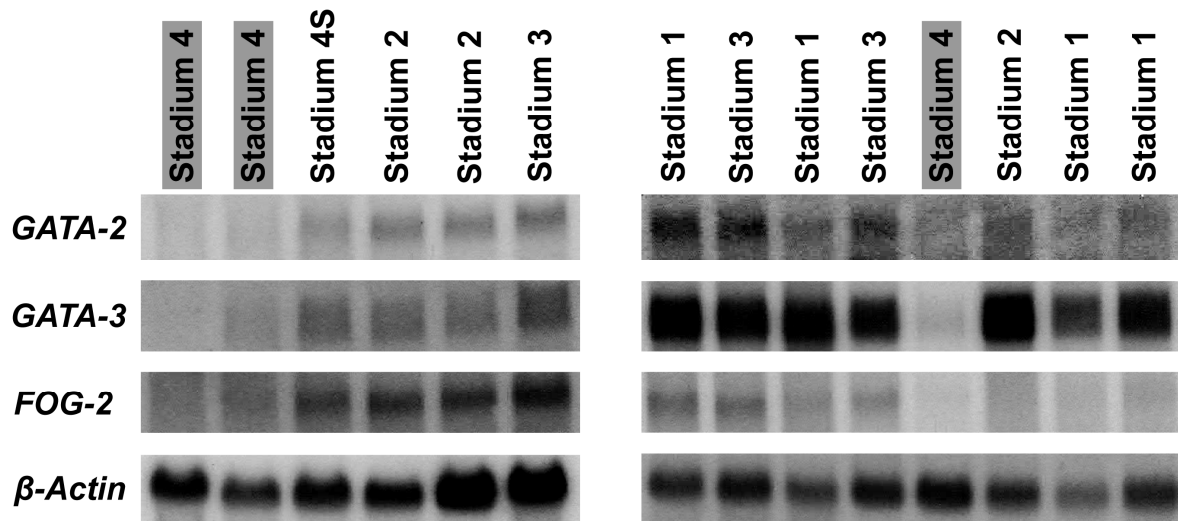


Abb. 3.6: Northern Blot für *GATA-2*, *-3* und *FOG-2* von 14 verschiedenen Neuroblastom-Proben unterschiedlicher Tumorstadien. *β -Actin* diente als Ladekontrolle.

Da die Etablierung des Nachweises von *GATA-4* mittels Northern Blot nicht erfolgreich war, wurde anschließend für alle vier Faktoren eine Real-time PCR von 73 Neuroblastom-Proben durchgeführt. Folgende Tumor-Klassifizierungen wurden hinsichtlich der Expressionsstärken verglichen: *MYCN*-nicht-amplifiziert vs. -amplifiziert, lokalisierte Stadien vs. Stadium 4, Stadium 4 vs. Stadium 4S und Patienten unter einem Jahr vs. über einem Jahr (Tab. 3.1-3.4). Hierbei zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich der *FOG-2* Expression in *MYCN*-nicht-amplifizierten vs. *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen, wobei die prognostisch günstigen *MYCN*-nicht-amplifizierten Tumoren eine höhere Expression aufwiesen.

Tab. 3.1: Real-time PCR für *GATA-2* von 73 humanen Neuroblastom-Proben. Klassifizierung nach *MYCN*-Status, Stadium und Alter bei Diagnose. Die Daten wurden normalisiert (s. 2.2.1.4). Dargestellt sind die Mediane, 25. und 75. Perzentile und die *p*-Werte (nicht-parametrischer Mann-Whitney-Test).

Klassifizierung		Median	25. P.	75. P.	<i>p</i> -Wert
<i>MYCN</i>	nicht-ampl. (n = 57)	25,07	10,28	43,85	0,083
	ampl. (n = 16)	11,97	5,40	23,44	
Stadium	lokalisiert (n = 30)	24,13	9,22	38,38	0,882 (lok. vs. 4)
	4 (n = 34)	22,85	8,39	43,85	0,511 (4 vs. 4S)
	4S (n = 9)	14,41	0,32	33,42	
Alter	< 1 Jahr (n = 29)	23,20	10,18	38,38	0,795
	> 1 Jahr (n = 44)	22,85	7,76	38,49	

Tab. 3.2: Real-time PCR für *GATA-3* von 73 humanen Neuroblastom-Proben. Die Daten sind wie in Tab. 3.1 dargestellt.

Klassifizierung		Median	25. P.	75. P.	<i>p</i> -Wert
<i>MYCN</i>	nicht-ampl. (n = 57)	1,48	1,16	1,91	0,514
	ampl. (n = 16)	1,41	1,02	1,82	
Stadium	lokalisiert (n = 30)	1,42	1,06	1,88	0,628 (lok. vs. 4)
	4 (n = 34)	1,47	1,17	2,13	0,420 (4 vs. 4S)
	4S (n = 9)	1,38	1,11	1,63	
Alter	< 1 Jahr (n = 29)	1,48	1,16	1,83	0,848
	> 1 Jahr (n = 44)	1,39	1,08	1,94	

Tab. 3.3: Real-time PCR für *GATA-4* von 73 humanen Neuroblastom-Proben. Die Daten sind wie in Tab. 3.1 dargestellt.

Klassifizierung		Median	25. P.	75. P.	<i>p</i> -Wert
<i>MYCN</i>	nicht-ampl. (n = 57)	1,28	0,67	1,93	0,096
	ampl. (n = 16)	1,85	0,99	2,74	
Stadium	lokalisiert (n = 30)	1,36	1,22	2,04	0,139 (lok. vs. 4)
	4 (n = 34)	0,92	0,46	2,27	0,338 (4 vs. 4S)
	4S (n = 9)	1,42	0,67	11,18	
Alter	< 1 Jahr (n = 29)	1,36	0,82	2,24	0,140
	> 1 Jahr (n = 44)	1,28	0,55	2,00	

Tab. 3.4: Real-time PCR für *FOG-2* von 73 humanen Neuroblastom-Proben. Die Daten sind wie in Tab. 3.1 dargestellt.

Klassifizierung		Median	25. P.	75. P.	<i>p</i> -Wert
<i>MYCN</i>	nicht-ampl. (n = 57)	5,25	2,56	7,92	< 0,001
	ampl. (n = 16)	1,26	0,80	3,07	
Stadium	lokalisiert (n = 30)	4,37	1,81	6,48	0,925 (lok. vs. 4)
	4 (n = 34)	3,96	1,53	7,09	0,199 (4 vs. 4S)
	4S (n = 9)	6,97	4,51	8,38	
Alter	< 1 Jahr (n = 29)	5,25	3,55	8,11	0,097
	> 1 Jahr (n = 44)	3,41	1,63	6,62	

Da eine Assoziation der GATA-Proteine oder FOG-2 mit prognostischen Faktoren beim Neuroblastom mittels Northern Blot und Real-time PCR nicht eindeutig festgestellt werden konnte, wurden im Folgenden die Expressionsstärken in einer größeren Kohorte ($n = 251$) mittels Microarray-Analyse untersucht. Hierbei wurden zusätzlich zu den bei der Real-time PCR vorgenommenen Klassifizierungen Hochrisiko- vs. Niedrigrisiko-Tumoren (nach der Genexpressions-basierten PAM-Klassifizierung (s. 1.2.2)) verglichen (Abb. 3.7-3.8). Für *GATA-2*, *-3* und *FOG-2* zeigte sich dabei eine höhere Expressionsstärke in prognostisch günstigeren Tumoren. So wurde *GATA-2* signifikant höher in *MYCN*-nicht-amplifizierten Tumoren (vs. *MYCN*-amplifizierten Tumoren; $p < 0,001$; Abb. 3.7 A) exprimiert. Ebenso fand sich eine höhere Expression in lokalisierten Tumoren (vs. Stadium 4; $p = 0,048$) und in solchen des Stadiums 4S (vs. Stadium 4; $p = 0,019$; beide Abb. 3.7 B) sowie bei jüngeren Patienten (< 1 Jahr) verglichen mit älteren Patienten (> 1 Jahr; $p < 0,001$; Abb. 3.7 C). Zudem wurde *GATA-2* stärker in Niedrigrisiko-Tumoren exprimiert (vs. Hochrisiko-Tumoren; $p < 0,001$; Abb. 3.7 D). *GATA-3* zeigte ein ähnliches Expressionsmuster. Auch hier wurden höhere Expressionsstärken in lokalisierten Stadien (vs. Stadium 4; $p = 0,039$; Abb. 3.7 F), jüngeren Patienten ($p = 0,027$; Abb. 3.7 G) und Niedrigrisiko-Tumoren ($p = 0,001$; Abb. 3.7 H) ausgemacht. Die deutlichsten Unterschiede gab es bei *FOG-2* mit einer hoch-signifikant erhöhten Expression in allen Tumoren mit günstiger Prognose (jeweils $p < 0,001$; Abb. 3.8 E-H). Die *GATA-4* Expression hingegen zeichnete ein anderes Bild. Hier exprimierten die *MYCN*-amplifizierten Tumoren mehr *GATA-4* als die *MYCN*-nicht-amplifizierten Tumoren ($p = 0,001$; Abb. 3.8 A). Vergleiche von Tumoren verschiedener Stadien oder von Patienten ungleichen Alters brachten keine signifikant unterschiedlichen Expressionsstärken hervor (Abb. 3.8 B). Tumoren mit einem nach der PAM-Klassifizierung höheren Risiko exprimierten *GATA-4* stärker als solche mit einem niedrigeren Risiko ($p = 0,001$; Abb. 3.8 D).

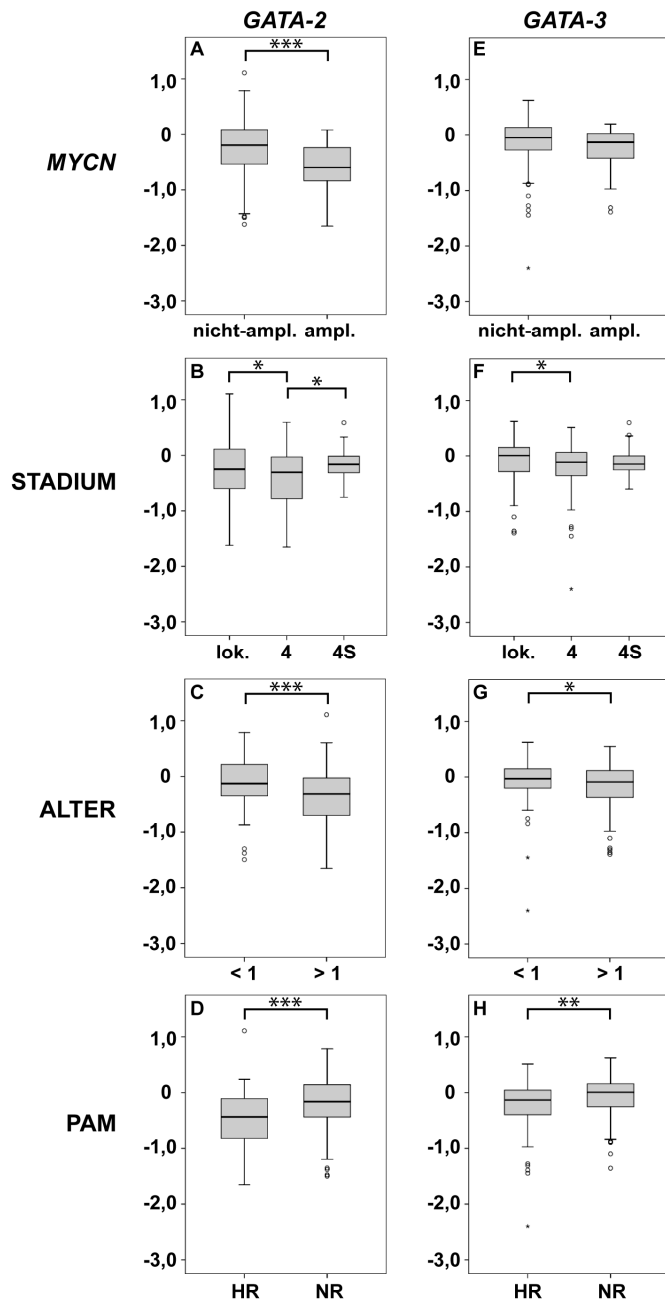


Abb. 3.7: Microarray-Analyse der relativen Expressionsstärken von *GATA-2* und *-3* in humanen Neuroblastom-Proben (n = 251). (A-D) *GATA-2* und (E-H) *GATA-3*. (A und E) *MYCN*-nicht-amplifiziert (n = 218) vs. *MYCN*-amplifiziert (n = 33). (B und F) Lokalisierte Stadien (n = 153) vs. Stadium 4 (n = 67) vs. Stadium 4S (n = 31). (C und G) Patienten mit einem Lebensalter unter einem Jahr (n = 94) vs. über einem Jahr (n = 157). (D und H) Hochrisiko- (HR; n = 82) vs. Niedrigrisiko-Tumoren (NR; n = 169) nach der PAM-Klassifizierung. Expressionswerte sind als logarithmische Verhältnisse (Proben- vs. Referenz-RNA) angegeben. Kästen: Mediane (horizontale Linie) und 25. und 75. Perzentile; *Whisker*: Distanz vom Ende des Kastens bis zum größten und kleinsten Wert kleiner als 1,5 Kastenlängen vom Kastenende; offene Kreise: Ausreißer; Sternchen: Extremwerte. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ nach dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

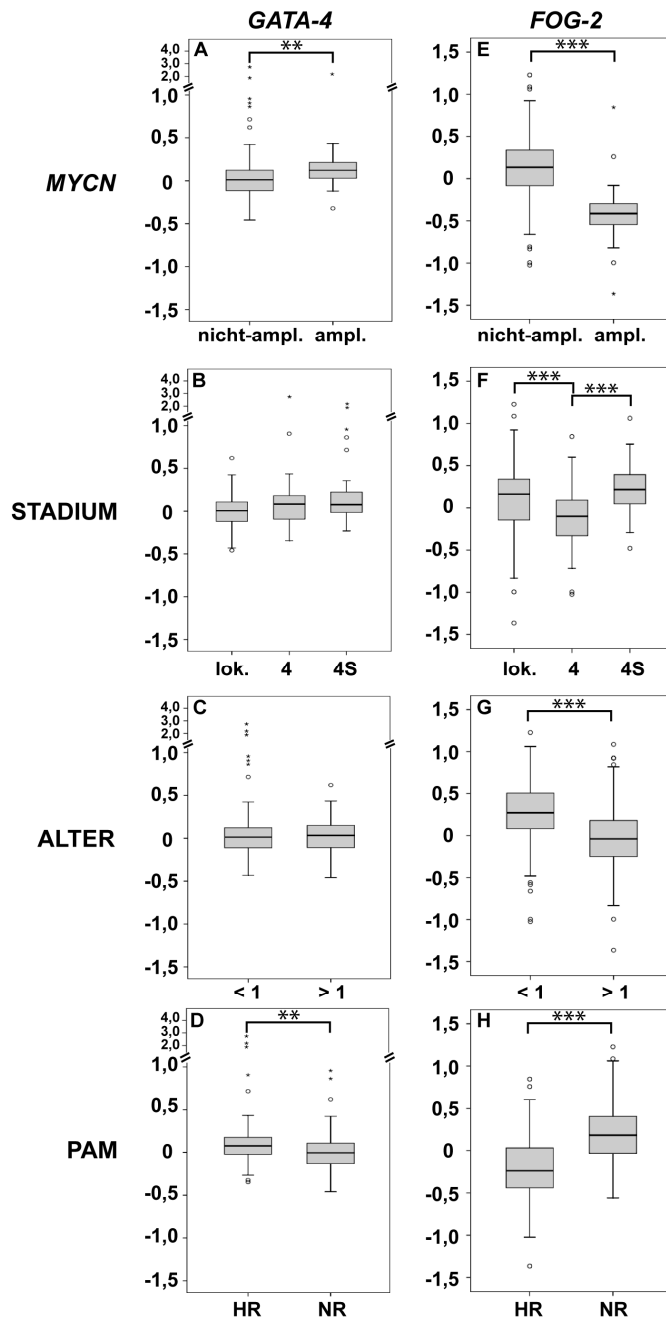


Abb. 3.8: Microarray-Analyse der relativen Expressionsstärken von *GATA-4* und *FOG-2* in humanen Neuroblastom-Proben (n = 251). (A-D) *GATA-4* und (E-H) *FOG-2*. (A und E) *MYCN*-nicht-amplifiziert (n = 218) vs. *MYCN*-amplifiziert (n = 32 für *GATA-4*; n = 33 für *FOG-2*). (B und F) Lokalisierte Stadien (n = 153) vs. Stadium 4 (n = 67) vs. Stadium 4S (n = 31). (C und G) Patienten mit einem Lebensalter unter einem Jahr (n = 94) vs. über einem Jahr (n = 157). (D und H) Hochrisiko- (HR; n = 82) vs. Niedrigrisiko-Tumoren (NR; n = 169) nach der PAM-Klassifizierung. Die Daten sind wie in Abb. 3.7 dargestellt. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ nach dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Zusammenfassend zeigte sich sowohl für die Expression von GATA-4 während der Entwicklung des sympathischen Nervensystems als auch für die Expression in primären humanen Neuroblastom-Proben ein deutlicher Unterschied zu GATA-2, -3 und FOG-2. Während GATA-4 in der Entwicklung nicht exprimiert wird, wird es in Neuroblastomen induziert und sowohl in *MYCN*-amplifizierten als auch in Hochrisiko-Tumoren (PAM-Klassifizierung) heraufreguliert. GATA-2, -3 und FOG-2 hingegen werden in Neuralleistenzellen exprimiert und zeigen in den Neuroblastomen mit günstiger Prognose eine höhere Expression. Um die Signifikanz für GATA-4 zu unterstreichen, wurden für GATA-4 Expressionsstärken auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Anhand der Microarray-Experimente wurden dafür vier Neuroblastom-Proben ausgewählt (zwei mit niedriger und zwei mit hoher *GATA-4* Expression). Die niedrige und hohe Expression bestätigte sich auch auf Proteinebene (Abb. 3.9).

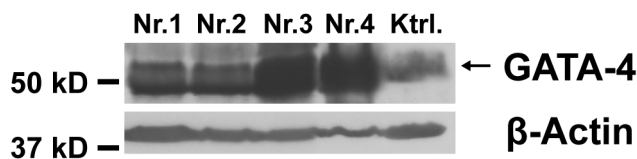


Abb. 3.9: Western Blot für GATA-4 von humanen Neuroblastom-Proben. Nr. 1 - Nr. 4 repräsentieren vier verschiedene Neuroblastom-Proben. β-Actin diente als Ladekontrolle. Ktrl. = Protein aus SH-SY5Y Zellen.

3.2 Einfluss von GATA-4 (+/- FOG-2) auf die Proliferation und Morphologie von Neuroblastomzellen

3.2.1 Vergleich der Expression von GATA-4 und FOG-2 in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien

Aufgrund der differenzierten GATA-4 Expression im Vergleich zu den anderen Faktoren wurde sich für die funktionellen Analysen auf GATA-4 konzentriert, wobei FOG-2 in manchen Experimenten als Kofaktor mit untersucht wurde. Dafür wurden zunächst die Expres-

sionsstärken von GATA-4 und FOG-2 in acht verschiedenen humanen Neuroblastom-Zelllinien auf Proteinebene verglichen (Abb. 3.10).

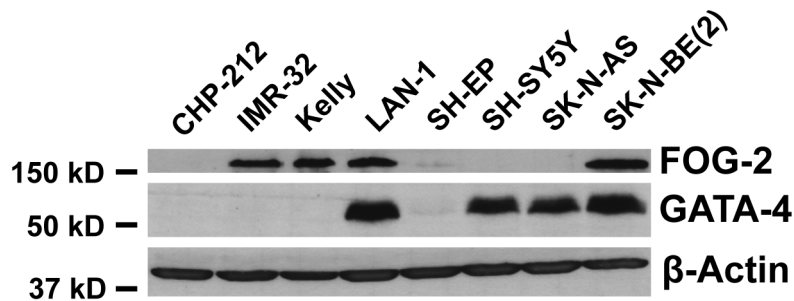


Abb. 3.10: Western Blot für GATA-4 und FOG-2 von Protein aus humanen Neuroblastom-Zelllinien. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Auch hier zeigte sich für GATA-4 und FOG-2 ein unterschiedliches Expressionsmuster. Beide Proteine wurden in LAN-1 und SK-N-BE(2) hoch und in SH-EP niedrig exprimiert. In IMR-32 und Kelly hingegen wurde FOG-2 hoch exprimiert, während GATA-4 nicht detektierbar war. Umgekehrt fand sich eine hohe GATA-4 Expression in SH-SY5Y und SK-N-AS im Gegensatz zu FOG-2 in diesen Zelllinien.

3.2.2 Überexpression von GATA-4 und FOG-2 in SH-SY5Y und SH-EP mittels Lentiviren

Um die Funktionen von GATA-4 und FOG-2 im Neuroblastom näher zu untersuchen, wurden diese Proteine zunächst in Neuroblastom-Zelllinien überexprimiert. Dies wurde mittels lentiviraler Transduktion realisiert. Als Beispiel für die Transduktionseffizienz sind die Zelllinien SH-SY5Y (N-Typ) und SH-EP (S-Typ) dargestellt. Beide wurden mit Lentiviren, die das Gen für GFP trugen, transduziert. Die Effizienz für SH-SY5Y Zellen lag bei etwa 100%, die für SH-EP Zellen zwischen 90 und 100% (Abb. 3.11).

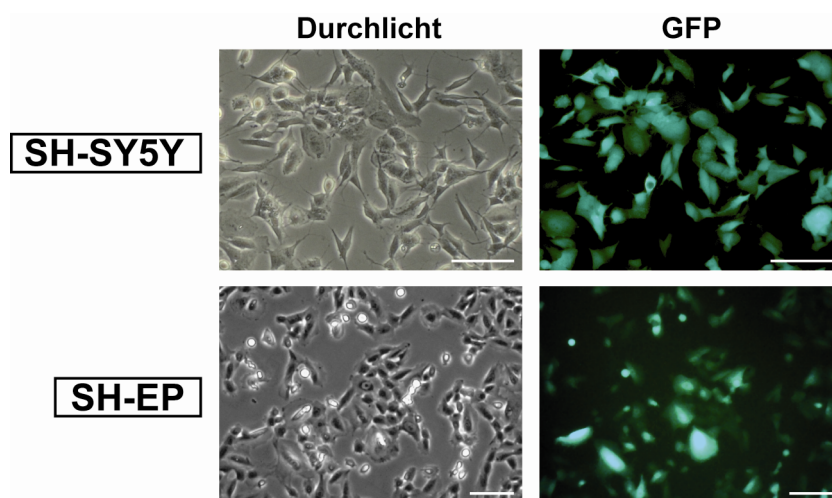


Abb. 3.11: Effizienz der lentiviralen Transduktion von SH-SY5Y und SH-EP Neuroblastomzellen. Links die Ansicht mittels Durchlicht- und rechts mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellen wurden mit Lentiviren, die das Gen für GFP trugen, transduziert. Aufnahmen an d7 (SH-SY5Y) bzw. d8 (SH-EP) nach Transduktion. Balken entsprechen 100 μm . Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf Experimenten.

Für die funktionellen Analysen wurden die Zelllinien mit Viren, die das Gen für GATA-4 bzw. FOG-2 trugen, transduziert. Als Kontrolle dienten jeweils GFP-transduzierte Zellen. Die Effizienz der Überexpression von GATA-4 (Abb. 3.12) als auch der von FOG-2 (Abb. 3.13) war sehr hoch, wie hier am Beispiel von SH-SY5Y und SH-EP auf RNA- und Proteinebene gezeigt. In der PCR-Analyse diente *WPRE* als Beleg dafür, dass die Expressionshöhe der Probe (GATA-4 bzw. FOG-2) in etwa der Expressionshöhe der Kontrolle (GFP) entsprach (s. 2.2.2.5).

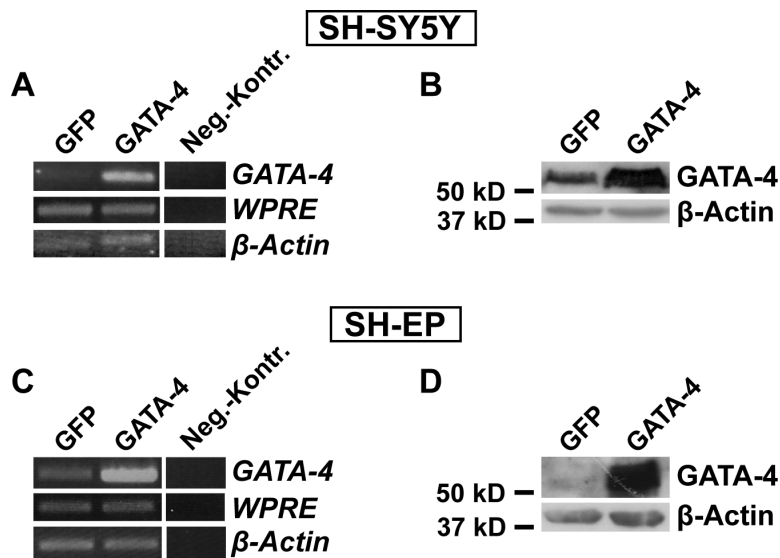


Abb. 3.12: Überexpression von GATA-4 in SH-SY5Y und SH-EP mittels Lentiviren. (A-B) SH-SY5Y und (C-D) SH-EP. (A und C) PCR für *GATA-4* in GFP- (Kontrolle) bzw. *GATA-4*-transduzierten Zellen. *WPRE* diente als Kontrolle der Virus-DNA-Integration. *β-Actin* diente als Ladekontrolle. Neg.-Kontr. = Negativ-Kontrolle mit H₂O statt cDNA. Zyklen (A): *GATA-4* = 24, *WPRE* = 32, *β-Actin* = 19. Zyklen (C): *GATA-4* = 28, *WPRE* = 30, *β-Actin* = 17. (B und D) Western Blot für *GATA-4* von Protein aus GFP- (Kontrolle) bzw. *GATA-4*-transduzierten Zellen. *β-Actin* diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

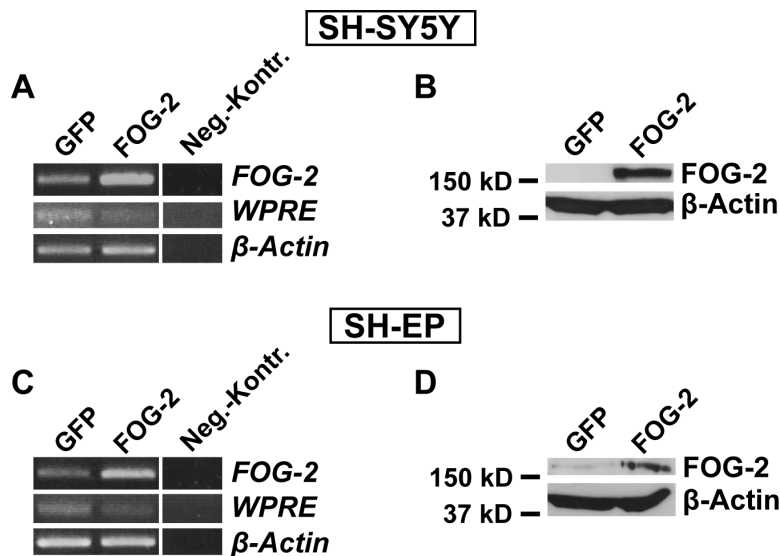


Abb. 3.13: Überexpression von FOG-2 in SH-SY5Y und SH-EP mittels Lentiviren. Analoge Darstellung zu Abb. 3.12. Zyklen (A): *FOG-2* = 27, *WPRE* = 32, *β-Actin* = 17. Zyklen (C): *FOG-2* = 27, *WPRE* = 35, *β-Actin* = 17.

3.2.3 Einfluss von GATA-4 und FOG-2 auf die Proliferation von Neuroblastomzellen

Nach der Etablierung der lentiviralen Transduktion für die Überexpression von GATA-4 und FOG-2 in humanen Neuroblastom-Zelllinien wurde der Einfluss beider Proteine auf die Proliferation der Zellen näher untersucht. Dafür wurde zunächst über elf Tage ein XTT-Assay durchgeführt, um in mehreren Zelllinien gleichzeitig den Effekt von GATA-4 bzw. FOG-2 auf die Anzahl lebender Zellen zu messen. Als Zelllinien wurden CHP-212, SH-EP, SH-SY5Y und SK-N-AS mit endogen niedriger bis mittlerer GATA-4 und FOG-2 Expression ausgewählt. Durch Überexpression von GATA-4 wurde in SH-EP und SH-SY5Y Zellen eine deutliche Proliferationshemmung an d7 und d11 erzielt (Abb. 3.14 B-C), wohingegen in CHP-212 und SK-N-AS Zellen kein Effekt zu verzeichnen war (Abb. 3.14 A und D). Ebenfalls kein Effekt auf die Proliferation wurde durch Überexpression von FOG-2 erreicht (nicht gezeigt). Viren, die das Gen für GFP trugen, dienten jeweils als Kontrolle.

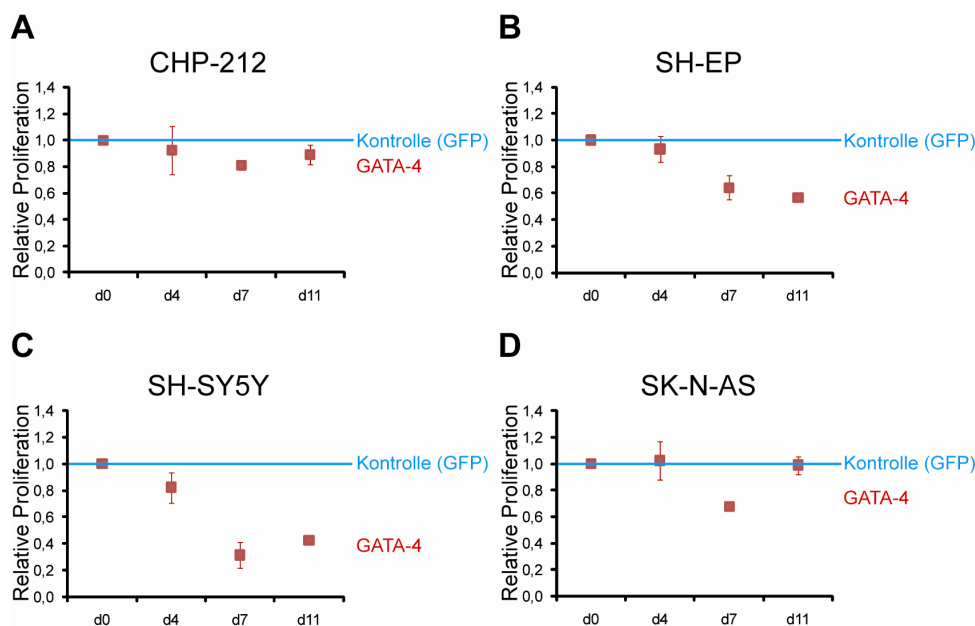


Abb. 3.14: XTT-Assay zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in Neuroblastom-Zelllinien nach Überexpression von GATA-4. (A) CHP-212, (B) SH-EP, (C) SH-SY5Y und (D) SK-N-AS. Dargestellt ist die relative Proliferation an den Zeitpunkten d0, d4, d7 und d11 im Vergleich zur Kontrolle (GFP) an den jeweiligen Zeitpunkten als Mittelwert \pm SD (Dreifachbestimmung).

Davon ausgehend wurden für die folgenden Experimente SH-SY5Y und SH-EP verwendet. Diese Zellen wurden transduziert und die lebenden Zellen an d4, d7 und d11 gezählt. In diesen Versuchen erfolgte die Zellzahlbestimmung nicht indirekt über den photometrischen Nachweis mittels XTT-Assay, sondern durch direktes Auszählen der lebenden Zellen in einer Zählkammer. Die deutliche Proliferationshemmung durch GATA-4 an d7 und d11 wurde in beiden Zelllinien bestätigt (Abb. 3.15 A). Da FOG-2 seinen Effekt als Kofaktor möglicherweise erst entfalten kann, wenn beide Proteine gleichzeitig überexprimiert werden, wurden in einem weiteren Versuch die Zellen mit beiden Virustypen kotransduziert. Hierbei wurde der Effekt der Hemmung durch GATA-4 etwas reduziert (Abb. 3.15 B). Auch tote Zellen wurden jeweils gezählt, um auszuschließen, dass die geringere Zellzahl nach Überexpression von GATA-4 oder GATA-4 und FOG-2 durch ein Absterben der Zellen verursacht wird. Hier konnte jedoch kein Unterschied zu den Kontrollzellen festgestellt werden (nicht gezeigt).

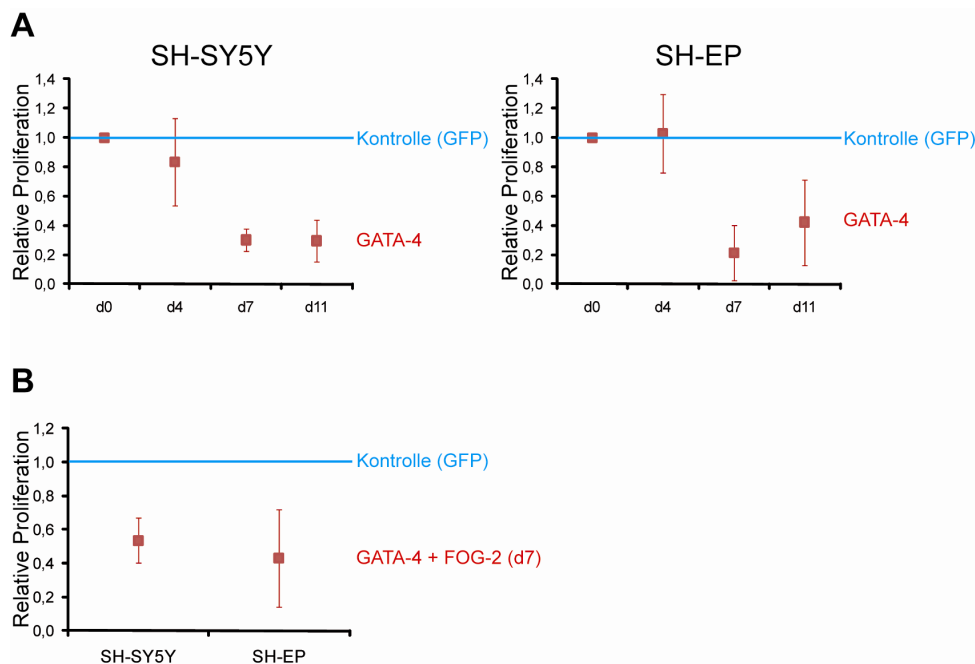


Abb. 3.15: Relative Proliferation von SH-SY5Y und SH-EP nach Überexpression von GATA-4 bzw. GATA-4 und FOG-2. (A) Links SH-SY5Y und rechts SH-EP nach Überexpression von GATA-4 (d4 und d11: n = 3; d0 und d7: n = 4). (B) Überexpression von GATA-4 und FOG-2 in SH-SY5Y und SH-EP (n = 3). Dargestellt ist die relative Proliferation an den Zeitpunkten d0, d4, d7 und d11 (A) bzw. d7 (B) im Vergleich zur Kontrolle (GFP) an den jeweiligen Zeitpunkten als Mittelwert \pm SD. Die Häufigkeitsangaben beziehen sich jeweils auf unabhängige Experimente.

3.2.4 Einfluss von GATA-4 auf die Morphologie von Neuroblastomzellen

Anschließend wurde untersucht, ob GATA-4 neben der Proliferation auch einen Effekt auf die Morphologie der Zellen ausübt. Dafür wurden die Zellen an d6 nach Transduktion mikroskopiert und fotografiert. Während sich SH-SY5Y Zellen morphologisch nicht veränderten, konnte bei SH-EP Zellen eine leichte Vergrößerung der Zellen festgestellt werden (Abb. 3.16). Anzeichen einer Differenzierung der Zellen, wie z. B. Neuritenwachstum, wurden nicht beobachtet. Demnach übt GATA-4 zwar einen Effekt auf die Proliferation aus, jedoch nur einen schwachen Effekt auf die Morphologie, und dies auch lediglich bei einer der beiden Zelllinien (SH-EP).

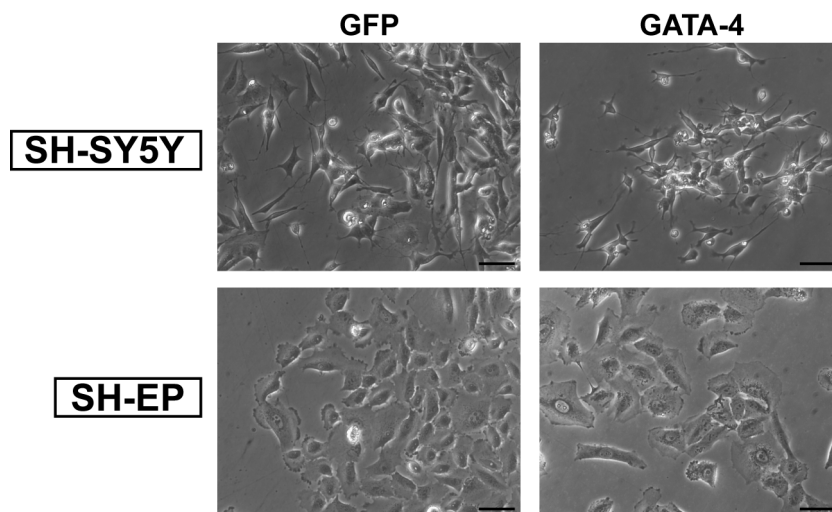


Abb. 3.16: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von Neuroblastom-Zelllinien nach Überexpression von GATA-4. Oben SH-SY5Y und unten SH-EP Zellen. Links Kontrollen (GFP) und rechts Zellen nach Überexpression von GATA-4. Aufnahmen an d6 nach Transduktion. Balken entsprechen 50 μm . Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf Experimenten.

3.3 Identifikation von Zielgenen von GATA-4 im Neuroblastom

3.3.1 Microarray-Analyse GATA-4 überexprimierender SH-SY5Y Zellen

Um herauszufinden, welche Gene in GATA-4 überexprimierenden Neuroblastomzellen gleichzeitig mit einer funktionellen Proliferationshemmung in ihrer Expression moduliert werden, wurden von SH-SY5Y Zellen nach Überexpression von GATA-4 Microarray-Analysen durchgeführt. Dafür wurde ein Neuroblastom-spezifischer Array verwendet, auf dem Gene des Neuroblastoms stärker repräsentiert sind als auf herkömmlichen Arrays. Zudem wurden zwei verschiedene Virusdosen verwendet, um eventuelle Dosis-abhängige Effekte auszumachen. Die statistische Auswertung ($p < 0,01$) ergab, dass 69 verschiedene Gene differentiell (GATA-4 im Vergleich zu GFP) exprimiert wurden. Davon wurden 45 Gene durch GATA-4 herauf- und 24 Gene herunterreguliert (Abb. 3.17).

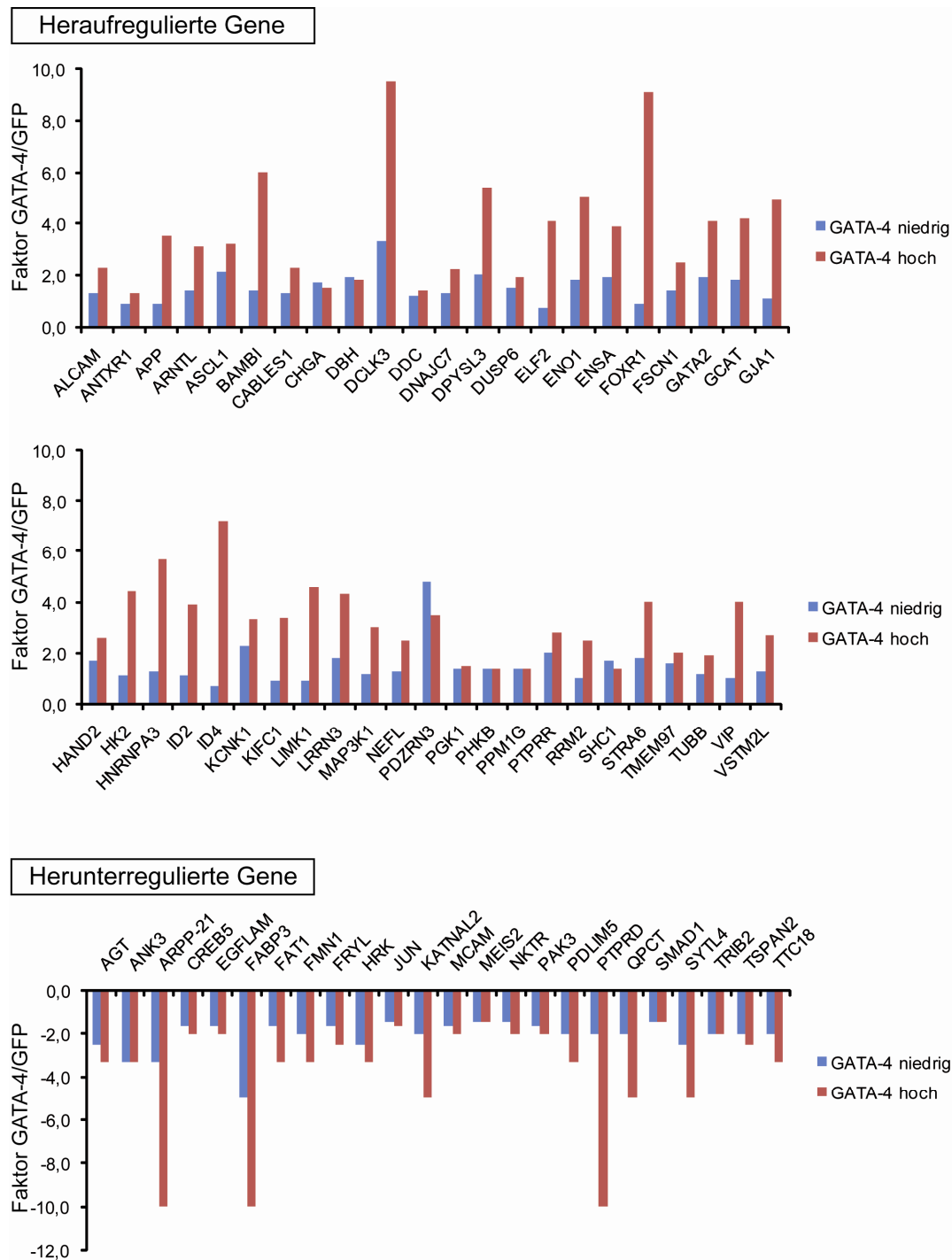


Abb. 3.17: Differenziell exprimierte Gene nach Microarray-Analysen von GATA-4 überexprimierenden SH-SY5Y Zellen. Herauf- (oben) bzw. herunterregulierte Gene (unten) in alphabetischer Reihenfolge. Dargestellt ist der Faktor, um den das Gen jeweils durch eine niedrige Virusdosis (GATA-4 niedrig; ca. vierfache Überexpression) bzw. eine höhere Dosis (GATA-4 hoch; ca. sechsfache Überexpression) verändert exprimiert wurde. Als Kontrolle dienten GFP-transduzierte SH-SY5Y Zellen. Statistische Auswertung ($p < 0,01$) mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA).

3.3.2 Auswahl von *DPYSL3* als potentielles Zielgen

Anschließend wurde für alle differentiell exprimierten Gene eine Literaturrecherche durchgeführt. Für alle Gene, die bereits in Zusammenhang mit neuronaler Differenzierung und/oder Zellproliferation erwähnt wurden, sowie für solche, bei denen ein bekannter Bezug zu GATA-Faktoren bestand, wurden die Expressionsdaten der Microarray-Analysen mittels PCR validiert. Schließlich wurde sich auf *dihydropyrimidinase-like 3* (*DPYSL3*) konzentriert, da für dieses Gen in unabhängigen Transduktionen konsistent eine Heraufregulation beobachtet wurde. Diese Wahl fiel auch deshalb, weil im Promotor von *DPYSL3* bereits zwei potentielle GATA-Bindungsstellen beschrieben wurden (Matsuo et al., 2000). Die Induktion von *DPYSL3* nach GATA-4 Überexpression wurde sowohl in SH-SY5Y als auch in SH-EP Zellen bestätigt (Abb. 3.18 A).

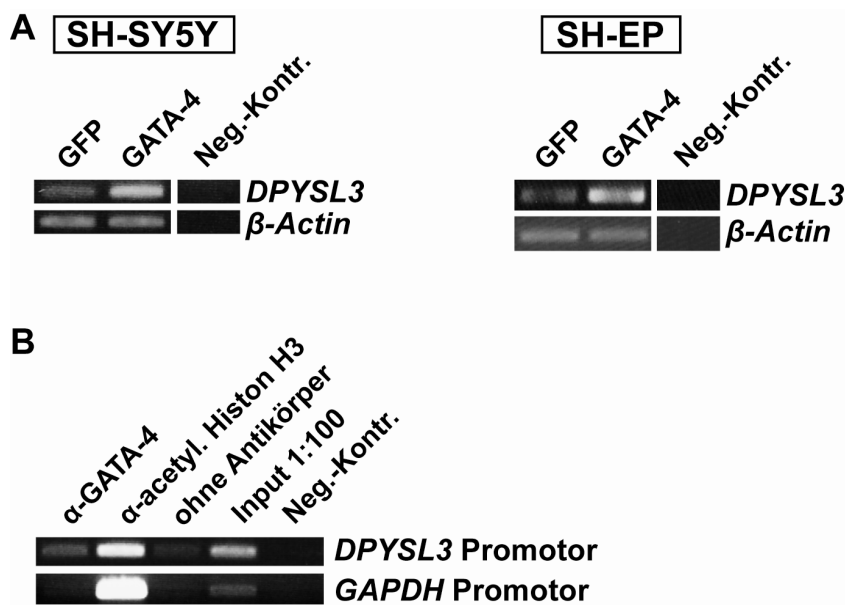


Abb. 3.18: *DPYSL3* als Zielgen von GATA-4 in Neuroblastom-Zelllinien. (A) PCR für *DPYSL3* von cDNA aus GATA-4 überexprimierenden SH-SY5Y (links) bzw. SH-EP Zellen (rechts) im Vergleich zur Kontrolle (GFP). β -Actin diente als Ladekontrolle. Neg.-Kontr. = Negativ-Kontrolle mit H₂O statt cDNA. Zyklen (SH-SY5Y): *DPYSL3* = 27, β -Actin = 18. Zyklen (SH-EP): *DPYSL3* = 27, β -Actin = 17. (B) ChIP-Assay SH-SY5Y/*DPYSL3* Promotor. PCR zur Amplifikation des Abschnittes zwischen -349 und -150 (relativ zum Transkriptionsstart) des humanen *DPYSL3* Promotors nach Durchführung des ChIP-Assays. Präzipitation mit Antikörpern gegen die jeweiligen Proteine. Input = Überstand nach Immunpräzipitation ohne Antikörper. Der *GAPDH* Promotor diente als Negativ-Kontrolle. Neg.-Kontr. = Negativ-Kontrolle mit H₂O statt cDNA. 37 Zyklen. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Anschließend sollte mittels eines ChIP-Assays die Bindung von GATA-4 an den Promotor von *DPYSL3* untersucht werden. Dafür wurden SH-SY5Y ausgewählt, da diese im Vergleich zu SH-EP Zellen GATA-4 endogen deutlich höher exprimieren (s. 3.2.1). Es zeigte sich eine schwache Bande nach Präzipitation mit dem monoklonalen Antikörper gegen GATA-4 (Abb. 3.18 B). Als Positiv-Kontrolle und Nachweis einer aktiven Transkription diente die Präzipitation mit dem Antikörper gegen acetyliertes Histon H3. Da *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) konstitutiv exprimiert wird, wurde als Negativ-Kontrolle ein Abschnitt dieses Promotors amplifiziert. Hier wurde lediglich die aktive Transkription nachgewiesen (Antikörper gegen acetyliertes Histon H3).

3.3.3 *Bcl-2* als potentiell Zielgen von GATA-4

Da GATA-4 die antiapoptotischen Gene *Bcl-2* und *Bcl-X_L* aktivieren kann (Aries et al., 2004; Kyrönlähti et al., 2008), wurde die Expression von *Bcl-2* nach GATA-4 Überexpression in SH-SY5Y und SH-EP Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass GATA-4 auch in Neuroblastomzellen *Bcl-2* induzieren kann (Abb. 3.19 A). In der 5'-UTR des humanen *Bcl-2* Gens (266 bp stromaufwärts des Translationsstarts) ist in HEK293 Zellen eine funktionell aktive GATA-Bindungsstelle detektiert worden (Kobayashi et al., 2006). Daher wurde nach einem ChIP-Assay in SH-SY5Y Zellen der entsprechende Bereich in der 5'-UTR von *Bcl-2* amplifiziert, und es konnte eine schwache Bindung nachgewiesen werden (Abb. 3.19 B). Als Positiv-Kontrolle und Nachweis einer aktiven Transkription diente wie bei *DPYSL3* die Präzipitation mit dem Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 und als Negativ-Kontrolle der *GAPDH* Promotor.

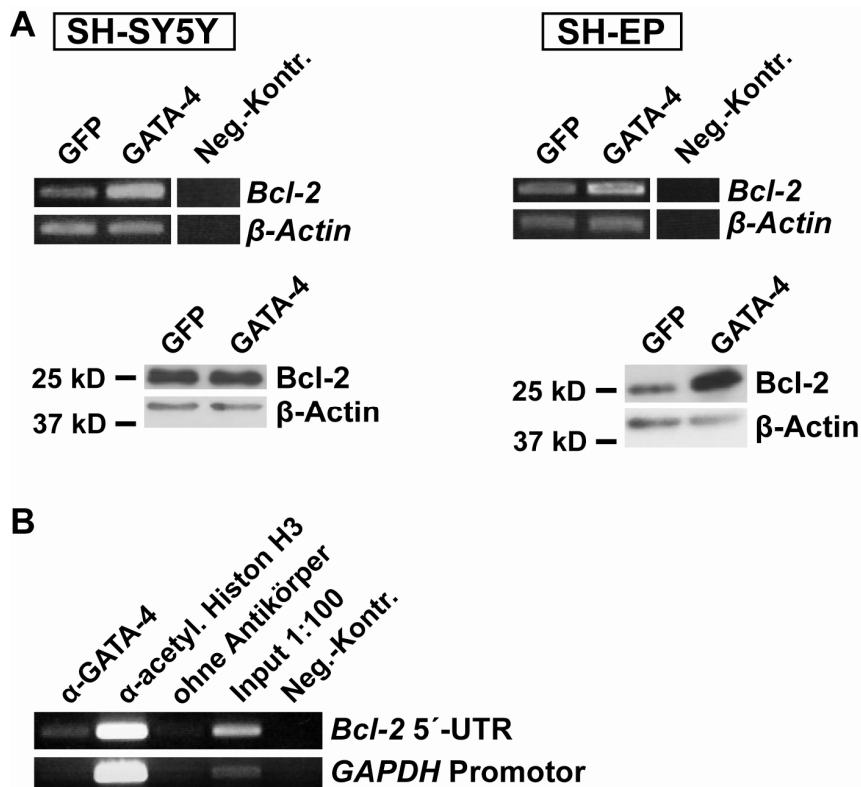


Abb. 3.19: *Bcl-2* als Zielgen von GATA-4 in Neuroblastom-Zelllinien. (A) PCR für *Bcl-2* von cDNA aus GATA-4 überexprimierenden SH-SY5Y (links) bzw. SH-EP (rechts) im Vergleich zur Kontrolle (GFP). *β-Actin* diente als Ladekontrolle. Neg.-Kontr. = Negativ-Kontrolle mit H₂O statt cDNA. Zyklen (SH-SY5Y): *Bcl-2* = 25, *β-Actin* = 18. Zyklen (SH-EP): *Bcl-2* = 30, *β-Actin* = 17. Darunter korrespondierender Western Blot. (B) ChIP-Assay SH-SY5Y/*Bcl-2* 5'-UTR. PCR zur Amplifikation des Abschnittes zwischen -378 und -149 (relativ zum Translationsstart) der humanen *Bcl-2* 5'-UTR nach Durchführung des ChIP-Assays. Präzipitation mit Antikörpern gegen die jeweiligen Proteine. Input = Überstand nach Immunpräzipitation ohne Antikörper. Der *GAPDH* Promotor diente als Negativ-Kontrolle. Neg.-Kontr. = Negativ-Kontrolle mit H₂O statt cDNA. 37 Zyklen. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

3.4 Einfluss von Retinsäure auf GATA-Faktoren in Neuroblastomzellen

Retinsäure spielt während der neuronalen Entwicklung eine entscheidende Rolle und wird aufgrund seiner wachstumshemmenden und differenzierenden Eigenschaften auch für die Therapie des Neuroblastoms eingesetzt (s. 1.2.3.1). Daher stellte sich die Frage, welchen Einfluss Retinsäure auf die Expression der GATA-Faktoren, insbesondere GATA-4, und FOG-2 hat. SH-SY5Y und SH-EP Zellen wurden dafür über acht Tage mit all-*trans* Retinsäure behandelt. Zunächst wurden die Proliferation und Morphologie der Zellen untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Proliferationshemmung in beiden Zelllinien (Abb. 3.20 A). Anhand der mikroskopischen Aufnahmen konnte zudem dargestellt werden, dass SH-SY5Y nach ATRA-Behandlung verlängerte Neuriten als Zeichen einer neuronalen Differenzierung aufwiesen. Bei SH-EP Zellen konnte morphologisch keine Differenzierung ausgemacht werden (Abb. 3.20 B).

Ferner wurde mittels quantitativer PCR der Effekt von ATRA auf die *GATA-4* Expression überprüft. Während sich in SH-SY5Y Zellen eine signifikant erhöhte *GATA-4* Expression an d4 und d8 fand, reagierten SH-EP Zellen nicht mit einer statistisch signifikant veränderten *GATA-4* Expression (Abb. 3.20 C). Wie für d8 gezeigt, konnte die Erhöhung von *GATA-4* in SH-SY5Y Zellen auf Proteinebene bestätigt werden. Die in SH-EP Zellen ohnehin vergleichsweise geringe *GATA-4* Proteinexpression wurde jedoch durch ATRA nicht beeinflusst (Abb. 3.20 C). Der Effekt von ATRA auf die Expression von *GATA-2*, -3 und *FOG-2* wurde zunächst mittels konventioneller PCR an d8 untersucht. Hierbei zeigte sich eine durch ATRA vermittelte Abnahme der *GATA-3* Expression in beiden Zelllinien, die ebenfalls auf Proteinebene (SH-SY5Y d7; SH-EP d8) bestätigt werden konnte.

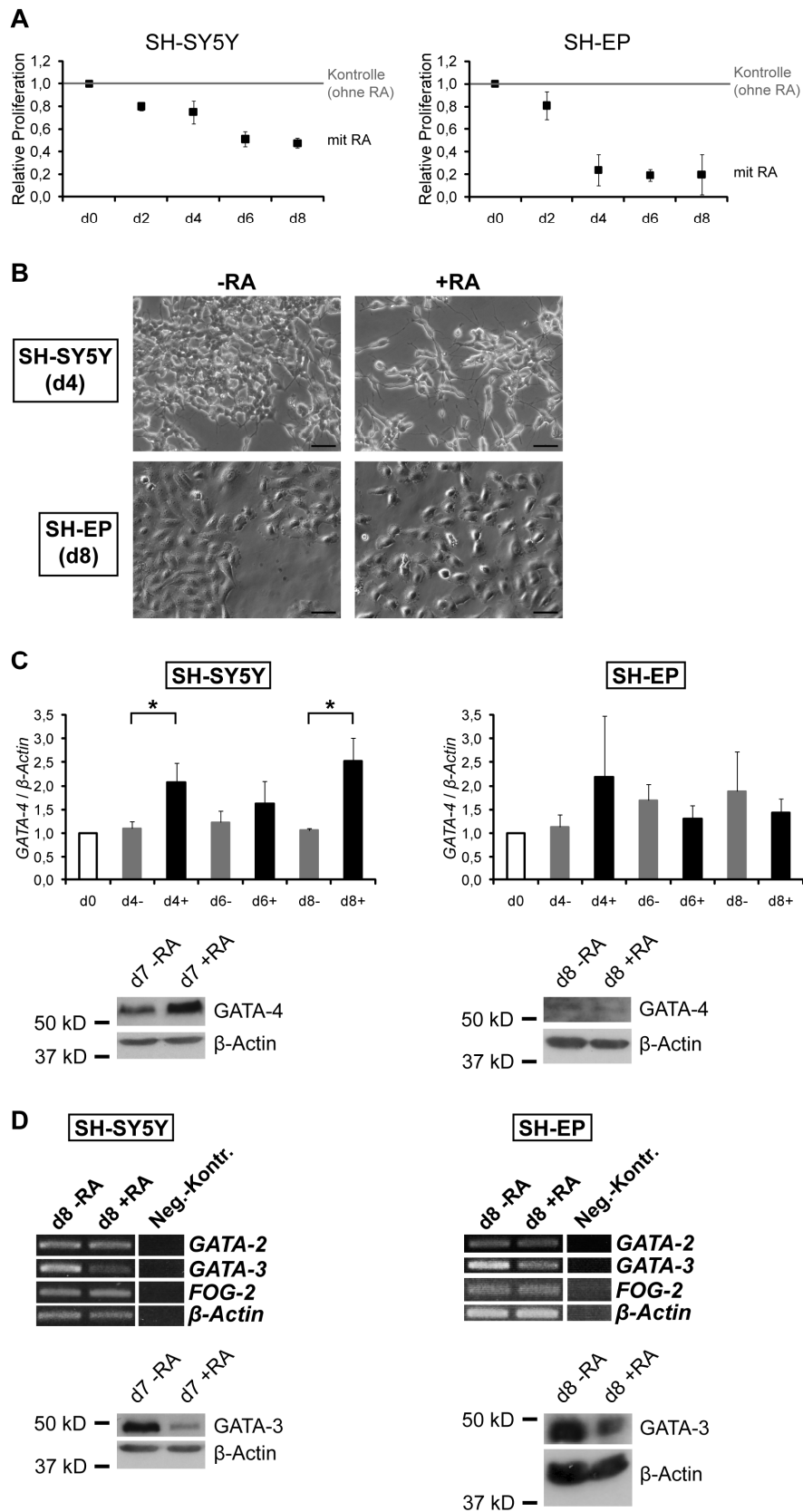


Abb. 3.20: Effekte von all-trans Retinsäure (ATRA; 10 μ M) in Neuroblastom-Zelllinien. (A) Einfluss von all-trans RA auf die Proliferation von SH-SY5Y (links) bzw. SH-EP Zellen (rechts). Dargestellt ist die relative Proliferation im Vergleich zur Kontrolle (DMSO statt RA) an den Zeitpunkten d0, d2, d4, d6 und d8 als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Mittelwerte der Zellzahlen von ATRA- und Kontrollzellen unterschieden sich an d4 und d8 signifikant voneinander (beide Zelllinien) sowie zusätzlich an d2 und d6 (SH-SY5Y). (B) Morphologie von SH-SY5Y (oben) und SH-EP Zellen (unten) nach Zugabe von ATRA. Durchlichtmikroskopische Aufnahme an d4 (SH-SY5Y) bzw. d8 (SH-EP). Links ohne ATRA, rechts mit ATRA. Balken entsprechen 50 μ m. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten. (C) Real-time PCR für *GATA-4* von cDNA aus SH-SY5Y (links) bzw. SH-EP Zellen (rechts) nach Behandlung mit ATRA. Dargestellt sind die relativen Expressionswerte im Vergleich zu β -Actin an d4, d6 und d8 als Mittelwerte \pm SD ($n = 3$). d0 = vor Behandlung. Schwarze Balken: mit RA; graue Balken: Kontrollen. Werte sind in Relation zu d0 angegeben. * = $p < 0,05$ nach dem Student's t-Test. Darunter Western Blot für GATA-4 von Protein aus ATRA-behandelten SH-SY5Y (links, d7) bzw. SH-EP Zellen (rechts, d8). SH-EP Zellen exprimieren endogen deutlich weniger GATA-4 als SH-SY5Y Zellen. Um in SH-EP Zellen GATA-4 zu detektieren, wurde hier im Vergleich zu SH-SY5Y Zellen eine zweifach höhere Primärantikörper-Konzentration eingesetzt. β -Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten. (D) PCR für *GATA-2*, -3 und *FOG-2* von cDNA aus ATRA-behandelten SH-SY5Y (links) bzw. SH-EP Zellen (rechts) an d8. β -Actin diente als Ladekontrolle. Neg.-Kontr. = Negativ-Kontrolle mit H₂O statt cDNA. Zyklen (SH-SY5Y): *GATA-2* und *GATA-3* = 24, *FOG-2* = 27, β -Actin = 16. Zyklen (SH-EP): *GATA-2* und *FOG-2* = 27, *GATA-3* = 25, β -Actin = 18. Darunter Western Blot für GATA-3 von Protein aus ATRA-behandelten SH-SY5Y (links, d7) bzw. SH-EP Zellen (rechts, d8). β -Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten. Die Häufigkeitsangaben beziehen sich jeweils auf unabhängige Experimente.

4 Diskussion

4.1 GATA-2, -3, -4 und FOG-2 im Neuroblastom

GATA-Transkriptionsfaktoren sind für die normale Entwicklung essentiell, und ihre Deregulation oder Mutation ist mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht worden. In dieser Arbeit wurde die Rolle der GATA-Transkriptionsfaktoren im Neuroblastom untersucht. Wie für funktionell aktive Transkriptionsfaktoren zu erwarten, wurden die GATA-Proteine im Zellkern der Neuroblastomzellen detektiert. FOG-2 war ebenfalls nukleär lokalisiert (Abb. 3.1 und 3.2). Die Expression von GATA-2 und -3 war bereits in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien beschrieben worden. So wurden mRNA und Protein beider Transkriptionsfaktoren in humanen und murinen Neuroblastom-Zelllinien detektiert (Della Ragione et al., 2001; George et al., 1994; Minegishi et al., 2005; Scherzer et al., 2008; Yang et al., 1994). Die nukleäre Lokalisation wurde jedoch lediglich für GATA-3 in der humanen Neuroblastom-Zelllinie NB-1 gezeigt (Yang et al., 1994). Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigten diese Befunde, ferner wurde auch GATA-4 in Kernextrakten von SH-SY5Y nachgewiesen (Wallach et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurde in einer früheren Studie ausgesagt, dass GATA-4 in Neuroblastom-Zelllinien nicht exprimiert wird, jedoch ohne experimentellen Nachweis (Krejci et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit kamen die Methoden PCR, Western Blot und Immunhistochemie zum Einsatz, welche die GATA-4 Expression in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien zeigten. Durch vorläufige Experimente kamen auch Aoyama *et al.* zu dem Schluss, dass GATA-2, -3, und -4 in Neuroblastom-Zelllinien exprimiert werden (Aoyama et al., 2005). Zudem wurde durch die hier erfolgte immunhistochemische Analyse die nukleäre Lokalisation von GATA-2, -3, -4 und FOG-2 nicht nur in einer Neuroblastom-Zelllinie, sondern erstmals auch in primärem Neuroblastom-Gewebe gezeigt.

Die Expression von FOG-2 in Neuroblastom-Zelllinien und im primären Neuroblastom-Gewebe war bislang nicht bekannt. Die Koexpression mit den Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3 und -4 im Neuroblastom legt nahe, dass FOG-2 als Kofaktor an der GATA-

vermittelten Regulation von Genen beteiligt sein könnte. Bei dem Vergleich der auf Microarrays basierenden Genexpressionsprofile von 251 Neuroblastomen ergab sich eine Korrelation zwischen den Expressionswerten von *GATA-2* und *FOG-2* (Pearson-Korrelationskoeffizient $r = 0,50$) sowie zwischen *GATA-3* und *FOG-2* ($r = 0,33$). Eine negative Korrelation fand sich für *GATA-4* und *FOG-2* ($r = -0,16$) (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass *FOG-2* im Neuroblastom zusammen mit *GATA-2* und/oder *-3* Genregulation vermitteln könnte. Obwohl *in vitro* alle *GATA*-Faktoren mit *FOG-2* interagieren können (Cantor und Orkin, 2005) und *FOG-2* je nach Zelltyp und Promotor als Koaktivator oder Korepressor dienen kann (Holmes et al., 1999; Lu et al., 1999; Svensson et al., 1999), bedeutet jedoch die Koexpression eines *GATA*-Faktors und eines *FOG*-Proteins nicht zwangsläufig auch deren funktionelle Interaktion. So wurde gezeigt, dass die *in vivo* Funktion von *Gata-2* und *-3* für die Mastzell- bzw. T-Zell-Entwicklung nicht von *Fog-1* abhängt, obwohl *Fog-1* exprimiert wird (Tsang et al., 1998). Die funktionelle Relevanz der Koexpression muss daher in zukünftigen Studien noch gezeigt werden.

4.2 *Gata-4* und *Fog-2* im sich entwickelnden Nervensystem

Im Gegensatz zur Expression im Neuroblastom wurde *Gata-4* weder im sich entwickelnden zentralen oder peripheren Nervensystem (einschließlich der Neuralleistenzellen) noch im postnatalen und adulten Gehirn der Maus detektiert (Abb. 3.3). In anderen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte in primären Neuronen aus Ratten-Embryonen sowie in Astrozyten und Mikroglia aus neonatalen Ratten ebenfalls kein *Gata-4* nachgewiesen werden (Wallach et al., 2009). Dies bestätigt frühe Arbeiten, in denen mittels Northern Blot (adultes Gewebe) und *in situ* Hybridisierung (embryonales und fetales Gewebe) im Gehirn der Maus kein *Gata-4* detektiert wurde (Arceci et al., 1993). Auch im humanen Gehirn konnte *GATA-4* mittels Northern Blot nicht nachgewiesen werden (Huang et al., 1995). Zu einem anderen Ergebnis kam eine kürzlich veröffentlichte Publikation (Agnihotri et al., 2009). Die Autoren beschreiben die Expression von *GATA-4* in Neuronen und Astrozyten verschiedener Bereiche des murinen und humanen embryonalen, postnata-

len und adulten ZNS. Diese Ergebnisse sind aufgrund fehlender Positiv- (z. B. Herz) und Negativ-Kontrollen (z. B. ohne Primär-Antikörper) jedoch schwierig zu beurteilen, zumal Paraffin-eingebettete Schnitte verwendet wurden. In eigenen Untersuchungen erwies sich der gleiche Antikörper als nicht geeignet, um in Paraffinschnitten eine spezifische Gata-4 Färbung zu erreichen. Da in der vorliegenden Arbeit das Herz vom jeweils selben Schnitt als Positiv-Kontrolle diente, wird davon ausgegangen, dass die hier gezeigte fehlende Färbung im ZNS tatsächlich auf eine fehlende Gata-4 Expression zurückzuführen ist.

Bezüglich der wandernden Neuralleistenzellen bestätigt auch eine jüngere Studie die fehlende Expression von Gata-4. In dieser konnte mittels *whole mount in situ* Hybridisierung eine endogene Expression von *Gata-4* nicht nachgewiesen werden (Pilon et al., 2008). Jedoch zeigten Pilon *et al.*, dass ein 5 kb langer Abschnitt des *Gata-4* Promotors der Ratte die Expression des Reportergens GFP in wandernden Neuralleistenzellen von Maus-Embryonen (E9,5-E11,5) bewirken kann. Dies betrifft jedoch nur einen kleinen Teil der Neuralleistenzellen und beschränkt sich vermutlich auf solche kardialen Ursprungs (Pilon et al., 2008). Diese Erklärung wird auch durch eine weitere Studie bekräftigt. Tomita *et al.* detektierten Gata-4 in einigen von Neuralleistenzellen abstammenden Zellen, jedoch erst nach Wanderung in das Herz (Tomita et al., 2005). Diese Zellen wurden als ruhende multipotente Stammzellen im adulten Herzen definiert, die als frühe kardiale Vorläuferzellen in Kardiomyozyten differenzieren können. Daher exprimieren vermutlich nur kardiale Neuralleistenzellen GATA-4 und nicht die Zellen, die zum sympathischen Nervensystem beitragen. Die *Gata-4* Expression im sich entwickelnden und adulten Herzen ist bereits seit Klonierung des murinen *Gata-4* beschrieben (Arceci et al., 1993), weshalb sie in den vorliegenden Experimenten auch als Positiv-Kontrolle diente. Möglicherweise ist der von Pilon *et al.* verwendete Promotorabschnitt vor dem Reportergen nicht geeignet, die endogene Expression von Gata-4 zu untersuchen. Auch der Mesoderm-spezifische *Enhancer* 40 kb (Rojas et al., 2005) sowie der kürzlich identifizierte Endoderm-spezifische *Enhancer* 80 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart (Rojas et al., 2009) deuten darauf hin, dass mit einem 5 kb langen Abschnitt des Promotors die endogene Expression nicht korrekt widerspiegelt wird. Aus primitiven embryonalen Stammzellen oder dem Epiblast der

Maus generierte Neurosphären exprimieren ebenfalls *Gata-4*, definitive neuronale Stammzellen weisen keine Expression mehr auf (Hitoshi et al., 2004). Da aus Epiblasten noch alle drei Keimblätter hervorgehen können, ist dieser Befund jedoch wenig überraschend.

Zusammenfassend wird daraus geschlossen, dass GATA-4 während der Entwicklung im Nervensystem nicht exprimiert wird, es sei denn die Expressionshöhe liegt unter dem Detektionslimit der hier und in der Literatur verwendeten Methoden. Die Expression von GATA-4 wird scheinbar erst während der Tumorgenese des Neuroblastoms induziert, was die Hypothese nahelegt, dass GATA-4 an der Tumorgenese beteiligt ist.

Der Nachweis der *Fog-2* Expression in wandernden Neuralleistenzellen (Abb. 3.4 A-B) und damit möglichen Vorläuferzellen eines Neuroblastoms ist ein neuer Befund. Des Weiteren wurde die Expression im akustikofazialen Ganglion nachgewiesen (Abb. 3.4 D). Dies wurde mittels *in situ* Hybridisierung an E11,5 bereits gezeigt (Tevosian et al., 1999), in der vorliegenden Arbeit jedoch einen Tag früher in der embryonalen Entwicklung und auf Proteinebene. Zudem konnte die Expression auf den medialen Teil des Ganglions spezifiziert werden. Vermutlich hat zumindest ein Teil dieses Ganglions seinen Ursprung in Zellen der Neuralleiste (Deol, 1967; Yang et al., 2008). Jedoch sind Spinal- und sympathische Ganglien *Fog-2*-negativ (Abb. 3.4 A, C, E-F), obwohl *Fog-2* in Spinalganglien mittels *in situ* Hybridisierung an E11,5 detektiert wurde (Tevosian et al., 1999). *Gata-2* und *-3* hingegen werden in der Entwicklung erst nach der durch *Phox2b*, *Hand2* und *Mash1* determinierten sympathischen Spezifizierung exprimiert; sie sind für die Generierung und Differenzierung sympathischer Neurone essentiell (Tsarovina et al., 2004). Da die biologische Funktion der FOG-Proteine im Zellkern sehr wahrscheinlich von der Interaktion mit GATA-Faktoren abhängt (Chang et al., 2002), bleibt unklar, mit welchem GATA-Protein FOG-2 in wandernden Neuralleistenzellen interagiert. Kürzlich ist gezeigt worden, dass die Ablation von *Fog-2* in Neuralleistenzellen mittels einer *wingless-type MMTV integration site 1 (Wnt1)-Cre* transgenen Maus ohne detektierbaren Defekt in der Herzentwicklung und ohne erkennbaren Phänotyp blieb (Zhou et al., 2009). Welche Rolle FOG-2 während der frühen neuronalen Entwicklung spielt, ist daher nicht geklärt. Auffällig ist jedoch, dass die FOG-2

Expression im Neuroblastom mit der GATA-2 und GATA-3 Expression korreliert; diese Korrelation ist während der normalen Entwicklung vermutlich nicht gegeben.

4.3 Expressionsanalysen in verschiedenen Subtypen des Neuroblastoms

Da sich nach den Expressionsanalysen im humanen Neuroblastom und im sich entwickelnden murinen Nervensystem abzeichnete, dass GATA-4 als einziges der untersuchten Proteine erst während der Tumorgenese induziert wird, wurden anschließend verschiedene Neuroblastom-Subtypen hinsichtlich der Expression der vier Faktoren untersucht. Sowohl *GATA-2* als auch *GATA-3* waren in den prognostisch günstigeren Tumoren höher exprimiert. Dies zeigte sich bereits bei der Analyse mittels Northern Blot, bei der in den ungünstigen Tumoren des Stadiums 4 die Expressionshöhen beider Faktoren vergleichsweise niedrig waren (Abb. 3.6). Statistische Signifikanz erlangte dieser Befund durch die Analyse einer großen Kohorte von 251 Patientenproben (Abb. 3.7). Auch in einer früheren Studie, in der mittels Genexpressionsprofilen eine Prognosevorhersage getroffen werden sollte, wurde *GATA-2* als eines von mehreren prognostisch günstigen Genen beim Neuroblastom identifiziert (Ohira et al., 2005). Bei Microarray-Analysen einer anderen Gruppe wurden *GATA-2* und *-3* ebenfalls verstärkt exprimiert in prognostisch günstigen Neuroblastomen nachgewiesen (Wilzen et al., 2009), was durch die vorliegende ausführliche Analyse bestätigt wird. Beim Brustkrebs ist beispielsweise gezeigt worden, dass eine hohe *GATA-3* Expression mit einem niedrigen Tumorgrad und einer verlangsamten Proliferation korreliert (Usary et al., 2004). *GATA-3* ist beim Brustkrebs somit ein günstiger prognostischer Marker; ob es ein unabhängiger Marker ist, ist jedoch nicht eindeutig geklärt (Mehra et al., 2005; Voduc et al., 2008). *GATA-3* hemmt zudem die Bildung von Metastasen durch die Umkehrung der epithelialen-mesenchymalen Transition (Yan et al., 2010). Im Gegensatz dazu ist *GATA-2* bei der akuten myeloischen Leukämie mit einer ungünstigen Prognose in Zusammenhang gebracht worden (Shimamoto et al., 1995), obwohl diese Assoziation in einer jüngeren Publikation in Frage gestellt wurde (Ayala et al., 2009). *GATA-3* ist beim Endometriumkarzinom ein Marker für einen aggressiven Phänotyp und eine schlechte

Prognose (Engelsen et al., 2008). Auch in thymischen Lymphomen hat Gata-3 onkogenes Potential, indem es vermutlich indirekt *c-myc* induziert (van Hamburg et al., 2008). Ob die GATA-Proteine mit einer günstigen oder ungünstigen Prognose assoziiert sind, ist demnach abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext des Tumors.

Ähnlich wie *GATA-2* und *-3* ist *FOG-2* in den Neuroblastomen mit günstiger Prognose höher exprimiert. Wie sich schon beim Northern Blot (Abb. 3.6) und der Real-time PCR (Tab. 3.1-3.4) andeutete, fand sich bei der Microarray-Analyse der 251 primären Neuroblastom-Proben eine signifikant erhöhte Expression für alle untersuchten Assoziationen zugunsten der *MYCN*-nicht-amplifizierten Tumoren, der lokalisierten Stadien und des Stadiums 4S, der jüngeren Patienten und der Niedrigrisiko-Neuroblastome (Abb. 3.8). Bei *FOG-2* gab es zudem im Vergleich mit den drei GATA-Proteinen die größten Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Subtypen. Diese ausführliche Analyse bestätigt eine frühere Studie, bei der *FOG-2* als eines von vielen differentiell exprimierten Genen mit einer höheren Expression in prognostisch günstigen Neuroblastomen identifiziert wurde (Ohira et al., 2003). Es wird diskutiert, ob ein Verlust von *Fog-2* zu Brustkrebs führen kann und die Expression von *Fog-2* mit einer günstigen Prognose assoziiert ist. Dabei wirkt *Fog-2* vermutlich als Kofaktor für Gata-3 (Manuylov et al., 2007). *FOG-2* wurde auch in anderen Tumoren (Granulosa- und Thekazelltumoren des Ovars; CIS Zellen des Hodens) nachgewiesen, jedoch ohne funktionelle Untersuchungen (Anttonen et al., 2005; Laitinen et al., 2000; Salonen et al., 2010). Möglicherweise übt *FOG-2* beim Neuroblastom seinen günstigen Effekt u. a. GATA-unabhängig über die Hemmung von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) aus. Kürzlich ist gezeigt worden, dass *FOG-2* im Zytoplasma an die regulatorische Untereinheit von PI3K (p85 α) binden kann, wodurch die Aktivität der PI3K gehemmt wird (Hyun et al., 2009). Gleichzeitig mehren sich die Hinweise über die Beteiligung von PI3K an onkogenen Signalwegen im Neuroblastom, weshalb die gezielte Inhibition einzelner PI3K jüngst für die Behandlung des Neuroblastoms vorgeschlagen wurde (Spitzenberg et al., 2010). Neben der nukleären Lokalisation von *FOG-2* konnte in einigen Neuroblastomzellen eine zusätzliche zytoplasmatische Färbung ausgemacht werden. Daher

ist die Hemmung der PI3K Aktivität zumindest eine mögliche Funktion von FOG-2 im Neuroblastom.

Ein umgekehrtes Bild bot sich bei dem Vergleich der Expressionswerte von *GATA-4*. In den prognostisch ungünstigen *MYCN*-amplifizierten Tumoren und solchen mit einem hohen Risiko nach der PAM-Klassifizierung wurden jeweils signifikant höhere *GATA-4* Expressionswerte detektiert als in den Vergleichsgruppen (Abb. 3.8). Die Tumoren der disseminierten Stadien 4 und 4S hatten eine leicht erhöhte *GATA-4* Expression gegenüber den lokalisierten Stadien, jedoch war diese Beobachtung statistisch nicht signifikant. Wenn auch die Expressionsunterschiede bei *GATA-4* eher gering ausfielen und die statistisch signifikanten Unterschiede erst in der relativ großen Kohorte von 251 Tumoren sichtbar waren, war auffällig, dass die Tendenz stets genau umgekehrt zu *GATA-2*, -3 und *FOG-2* war. Interessanterweise zeigte eine kürzlich veröffentlichte parallele Genom- und Proteomanalyse von Neuroblastomen des Stadiums 4 mit *MYCN*-Amplifikation (4+) verglichen mit solchen des Stadiums 1 ohne *MYCN*-Amplifikation (1-), dass *GATA-4* möglicherweise an der Regulation der 4+-Tumoren beteiligt sein könnte (Chen et al., 2010). Dies ergab sich aus einer Proteinnetzwerkanalyse differentiell exprimierter Proteine und unterstützt die hier vorgestellte Microarray-basierende Analyse der Primärtumoren hinsichtlich *GATA-4*. Im Einklang dazu stehen die Erkenntnisse aus den Granulosazelltumoren des Ovars, in denen eine hohe *GATA-4* Expression mit dem aggressiven Verhalten des Tumors assoziiert wird (Anttonen et al., 2005). Auch in CIS Zellen des Hodens wurde *GATA-4* detektiert. Normalerweise während der Differenzierung früher Gonozyten in Spermatogonien herunterreguliert, trägt *GATA-4* hier vermutlich zum unreifen Phänotyp der CIS Zellen bei (Salonen et al., 2010). Beim Ovarialkarzinom zeigt sich ein etwas differenzierteres Bild. Während seröse Ovarialkarzinome in der Regel kein *GATA-4* exprimieren, fand sich eine nukleäre Färbung in zwei Dritteln der muzinösen Ovarialkarzinomen. Dabei korrelierte die Färbung umgekehrt proportional mit dem Grad und dem Stadium des Tumors, d. h. Tumoren der höheren Grade und Stadien exprimierten häufiger kein *GATA-4* (Lassus et al., 2001). *GATA-4* werden daher je nach Tumor ganz unterschiedliche Funktionen zugeschrieben.

Eine mögliche Funktion von GATA-4 ist die Regulation der antiapoptotischen Gene *Bcl-2* und *Bcl-X_L*.

Es hat sich in mehreren Studien gezeigt, dass in Neuroblastomen mit einer günstigen Prognose solche Gene heraufreguliert sind, die an der neuronalen Differenzierung beteiligt sind bzw. Marker reifer neuronaler Gewebe repräsentieren. Umgekehrt sind die molekularen Mechanismen der DNA-Replikation und des Zellzyklus in den ungünstigen Neuroblastomen verstärkt aktiv (Chen et al., 2010; Fischer et al., 2006; Nakagawara und Ohira, 2004; Ohira et al., 2003). Die Beobachtung, dass *Gata-2* und *-3* während der embryonalen Entwicklung in sympathischen Ganglien exprimiert werden (Tsarovina et al., 2004) und in der vorliegenden Microarray-Analyse mit günstigen Neuroblastomen assoziiert sind, bestätigt die Hypothese, dass die Prozesse der normalen Entwicklung in diesem Neuroblastom-Subtyp intakt sind. Zudem wurde gezeigt, dass die Überexpression von GATA-2 in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-BE(2) zur Differenzierung der Zellen führt (Kaneiko et al., 2006). Ferner bewirkt die Überexpression von Gata-2 in murinen Neuroblastomzellen (NB2a) einen Proliferationsstop der Zellen, jedoch ohne Einfluss auf die Differenzierung (El Wakil et al., 2006). Mit Hilfe eines Mausmodells und einer retroviralen Überexpression von Gata-3 belegten Kouros-Mehr *et al.*, dass Gata-3 beim Brustkrebs die zelluläre Differenzierung induziert (Kouros-Mehr et al., 2008). Interessanterweise ist kürzlich gezeigt worden, dass GATA-3 über die transkriptionelle Aktivierung von Cyclin D1 die Proliferation von Neuroblastomzellen reguliert (Molenaar et al., 2010). Der *Knock-down* von GATA-3 mittels siRNA in der humanen Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 führte zu einer Abnahme an Cyclin D1 Protein, einhergehend mit einer verminderten Proliferation und morphologischen Anzeichen einer neuronalen Differenzierung. Dies ist allerdings der umgekehrte Effekt, der nach den hier präsentierten Daten bezüglich der primären Neuroblastome für GATA-3 erwartet worden wäre. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass für die eigene Microarray-Analyse der 251 Neuroblastome sämtlich undifferenzierte Neuroblastome verwendet wurden. Eine Analyse der differenzierteren Ganglioneuroblastome oder Ganglioneurome könnte hilfreich sein, um zu klären, welche Rolle die GATA-Proteine und FOG-2 in differenzierteren neuroblastischen Tumoren *in vivo* spielen. Zudem gibt es eine

Fülle an Neuroblastom-Zelllinien, die sich bedingt durch die ausgesprochene Heterogenität des Neuroblastoms in ihren molekularen und phänotypischen Eigenschaften sehr unterscheiden (s. 1.2.4). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass GATA-3 in einer anderen Zelllinie eine andere Wirkung erzielen könnte. Molenaar *et al.* stellten zwar auch in primären Tumoren eine Korrelation zwischen den Expressionswerten von *Cyclin D1* und *GATA-3* fest, diese Analyse schloss jedoch Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome ein. Dies bekräftigt umso mehr, dass ein Vergleich mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht ohne weiteres möglich ist. Letztlich sind Neuroblastom-Mausmodelle erforderlich, um die Rolle von GATA-3 und anderen Proteinen im Neuroblastom *in vivo* näher zu charakterisieren. Bei der Diskussion der Rolle von GATA-4 im Neuroblastom wird auf den Aspekt der veränderten Proliferation in Neuroblastomzellen noch näher eingegangen.

In luminalen Brustepithelzellen trägt Fog-2 möglicherweise zur Differenzierung bei, indem es an der Regulation von *Esr1* und *Foxa1* beteiligt ist (Manuylov et al., 2007). Ob FOG-2 beim Neuroblastom ebenfalls zur Differenzierung und damit möglicherweise zum regressiven Phänotyp beiträgt, ist nicht geklärt. Nach lentiviraler Überexpression von FOG-2 in vier verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien mit fehlender bis geringer FOG-2 Expression (CHP-212/SH-EP/SH-SY5Y/SK-N-AS) konnten keine Merkmale neuronaler Differenzierung (z. B. verlängerte Neuriten) und auch kein Einfluss auf die Proliferation ausgemacht werden (nicht gezeigt). Die Detektion von Fog-2 in wandernden Neuralleistenzellen und dessen verstärkte Expression in allen günstigen Neuroblastom-Subtypen bekräftigt dagegen, dass in diesen Tumoren Gene der normalen neuronalen Differenzierung aktiv sind. Die niedrigen Expressionswerte in den ungünstigen Subtypen wiederum sind in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass in diesen Tumoren die Prozesse der normalen Differenzierung gestört sind.

Umgekehrt konnte Gata-4 in den Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems nicht detektiert werden, während es im Neuroblastom - mit einer leichten Tendenz zugunsten der aggressiveren Tumoren - exprimiert wird. Möglicherweise spiegelt die leicht erhöhte Expression von GATA-4 in den *MYCN*-amplifizierten Tumoren deren unreiferen Charakter

wider. So wurde kürzlich von Chen *et al.* gezeigt, dass Proteine embryonaler und neuronaler Stammzellen in 4+-Tumoren (Neuroblastome des Stadiums 4 mit *MYCN*-Amplifikation) signifikant erhöht exprimiert werden, verglichen mit Tumoren des Stadiums 1 ohne *MYCN*-Amplifikation (Chen *et al.*, 2010). *Gata-4* wird in Neurosphären aus primitiven neuronalen Stammzellen exprimiert, definitive neuronale Stammzellen zeigen keine *Gata-4* Expression mehr (Hitoshi *et al.*, 2004), was die Hypothese der höheren GATA-4 Expression in unreifen Tumoren unterstützt.

Unklar bleibt, welche Faktoren für die differentielle Genexpression der GATA-Faktoren und von FOG-2 im Neuroblastom verantwortlich sind. Zur Regulation dieser Proteine ist bislang wenig bekannt. Zusätzlich zur Regulation auf transkriptioneller Ebene sind auch epigenetische Regulationsmechanismen denkbar, wie für GATA-4 in verschiedenen Tumoren beschrieben (vgl. 1.1.1.1). Dazu gehört auch die Regulation über endogene miRNAs. Wie in anderen Tumoren sind miRNAs auch im Neuroblastom relevant und üben dort sowohl die Funktion von Tumorsuppressoren als auch von Onkogenen aus (Schulte *et al.*, 2009). In jüngerer Zeit mehren sich die Studien über Zielgene von miRNAs, wobei auch GATA-Proteine und FOG-2 als direkte oder indirekte Zielgene beschrieben wurden (Adams *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2009; Ikeda *et al.*, 2009). Jedoch sind die in dieser Arbeit gezeigten Expressionsunterschiede in den Neuroblastomen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detektiert worden; sollten also miRNAs an der Regulation der GATA-Proteine und FOG-2 beteiligt sein, dann erfordert dies die Bindung der miRNAs an die Zielgen mRNA mit einem hohen Grad an Komplementarität. Es wird diskutiert, ob miRNAs ihre Wirkung bevorzugt über weniger komplementäre Bindung und daher translationale Repression ausüben, dies ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt (Bartel, 2004). Auch hypoxische Regionen innerhalb des Tumors können die Genexpression beeinflussen. Für das Neuroblastom konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die Genexpression dahingehend verändert, dass die Tumorzellen dedifferenzieren und einen unreifen Phänotyp annehmen (Jögi *et al.*, 2002). Dass die Expression von *Gata-4* durch Hypoxie induziert werden kann, ist im murinen Herzen gezeigt worden. Dabei wurden Mäuse fünf Zyklen von abwechselnd 2 min Hypoxie (10% O₂) und 2 min Normoxie (21% O₂) ausgesetzt; 2 h

nach Behandlung war die *Gata-4* Expression im Herzen signifikant erhöht (Park et al., 2007). Neben der veränderten Genregulation sollte noch ein weiterer Grund für unterschiedliche Expressionsmuster in Tumor-Subtypen in Betracht gezogen werden. So wird beim Brustkrebs diskutiert, ob nicht die Herunterregulation von Gata-3 in differenzierten Tumorzellen für die Tumorphoregression verantwortlich ist, sondern die Proliferation Gata-3-negativer Stammzell-ähnlicher Zellen (Kouros-Mehr et al., 2008).

4.4 Die Rolle von GATA-4 im Neuroblastom

Aufgrund der Besonderheit von GATA-4, die sich nach den Expressionsanalysen herausstellte, wurde sich für die funktionellen Analysen auf GATA-4 konzentriert. Zudem wurde auch FOG-2 als möglicher Kofaktor untersucht. Zunächst wurden die Expressionshöhen von GATA-4 und FOG-2 in acht verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien auf Proteinebene verglichen. Dabei ergab sich, dass sich mit Ausnahme von zwei Zelllinien, bei denen beide Proteine nur gering exprimiert wurden, beide Proteine reziprok zueinander verhielten (Abb. 3.10). Nur in den beiden Zelllinien mit der höchsten GATA-4 Expression konnte auch FOG-2 detektiert werden. Die anderen beiden GATA-4-positiven Zelllinien waren FOG-2-negativ. Umgekehrt gab es zwei FOG-2-positive Zelllinien, in denen kein GATA-4 detektiert werden konnte. Auch wenn Neuroblastom-Zelllinien meist von aggressiven Tumoren der Stadien 3 und 4 abstammen (Tonini, 1993), spiegelt sich in diesem Expressionsmuster das wider, was nach der Expressionsanalyse der primären Tumoren erwartet wurde: ein in etwa umgekehrtes Verhältnis der Expressionen von GATA-4 und FOG-2 zueinander. Es kann anhand der Expressionen kein Rückschluss auf den Typ der Zelllinie gezogen werden (N-/S-/I-Typ; s. 1.2.4). So wiesen die beiden N-Typ Zelllinien (Kelly und SH-SY5Y) bzw. die beiden S-Typ Zelllinien (SH-EP und SK-N-AS) ganz unterschiedliche Expressionsmuster auf. Interessant war der Befund, dass sich die beiden Zelllinien, die aus derselben Parental-Zelllinie stammen (SH-EP und SH-SY5Y; Parental-Zelllinie SK-N-SH), deutlich in ihrer GATA-4 Expressionshöhe unterschieden. Dies könnte durch die auch im Zusammenhang mit *MYCN*-Amplifikation beschriebene intratumorale Heterogenität be-

dingt sein (Kerbl et al., 2002; Theissen et al., 2009). SH-EP und SH-SY5Y Zellen unterscheiden sich zwar nicht in ihrem *MYCN* Status (beide *MYCN*-nicht-amplifiziert), jedoch in ihrer *MYCN* Expression, welche in SH-SY5Y Zellen höher ausfällt (Cohen et al., 2003; Sadée et al., 1987). Die höhere *MYCN* Expression könnte zumindest ein Grund für die höhere GATA-4 Expression in SH-SY5Y Zellen sein, da, wie hier gezeigt, GATA-4 auch in den *MYCN*-amplifizierten primären Neuroblastomen höher exprimiert wird.

Nach Etablierung der lentiviralen Überexpression von GATA-4 und FOG-2 (Abb. 3.12-3.13) wurde deren Einfluss auf die Proliferation von Neuroblastomzellen untersucht. Bei einer ersten Analyse von vier Zelllinien stellte sich heraus, dass zwei der vier Zelllinien (SH-SY5Y und SH-EP) auf die Überexpression von GATA-4 mit einer verlangsamten Proliferation reagierten (Abb. 3.14), was durch eine ausführliche Untersuchung bestätigt wurde (Abb. 3.15). Der Einfluss von GATA-4 auf Neuroblastomzellen ist demnach vom jeweiligen Zellkontext abhängig, und bei der Heterogenität der Neuroblastom-Zelllinien ist es wenig überraschend, dass nicht alle Zelllinien reagierten. Die GATA-4 Überexpression führte zu keiner gesteigerten Apoptose. Daher muss die verringerte Zellzahl auf eine Proliferationshemmung zurückzuführen sein. Interessant ist, dass die beiden sensiblen Zelllinien, wie bereits erwähnt, ursprünglich aus demselben Tumor stammen. Beide Zelllinien sind jedoch morphologisch sehr unterschiedlich (s. 1.2.4), und sie differieren beispielsweise auch in ihrem Karyotypen mit jeweils einzigartigen chromosomalen Auffälligkeiten (Ross et al., 1983). Um eine generelle Aussage zu treffen und damit dem Grund für die verlangsamte Proliferation näher zu kommen, könnten die Analyse weiterer Zelllinien sowie *in vivo* Untersuchungen hilfreich sein.

GATA-4 kann in unterschiedlichen Zelltypen proliferationsfördernd, aber auch -hemmend wirken. So fördert Gata-4 zum einen die Proliferation von Kardiomyozyten in der frühen Entwicklung des rechten Herzventrikels in der Maus, vermutlich über die direkte transkriptionelle Aktivierung von *Cyclin D2* und *Cdk4* (Rojas et al., 2008). Ein proliferationshemmender Effekt ist hingegen in GATA-4 überexprimierenden humanen und murinen Astrozyten gezeigt worden, verbunden mit einer Abnahme an Cyclin D1 und des

Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p15INK4B (Agnihotri et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden Cycline als mögliche Zielgene von GATA-4 im Zusammenhang mit der verminderten Proliferation nicht untersucht; sie könnten für zukünftige Studien ein vielversprechender Ansatz sein.

Die proliferationshemmende Wirkung von GATA-4 in Neuroblastomzellen steht zunächst im Widerspruch zu der aus den primären Neuroblastomen gewonnenen Erkenntnis, dass GATA-4 eher in den Neuroblastomen mit *MYCN*-Amplifikation und in denen mit einem höheren Risiko verstärkt exprimiert wird. Möglicherweise ist eine verlangsamte Proliferation jedoch an der schlechteren Therapierbarkeit der prognostisch ungünstigeren Neuroblastome beteiligt. Studien beim Brustkrebs oder beim malignen Melanom haben beispielsweise gezeigt, dass Tumorzellen mit einer höheren proliferativen Aktivität besser auf Chemotherapie ansprechen als weniger stark proliferierende Tumorzellen (Karlsson et al., 1996; Remvikos et al., 1989). *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome sprechen zwar in der Regel gut auf Chemotherapie an, entwickeln jedoch häufig eine Chemoresistenz (Goldsmith und Hogarty, 2005). Möglicherweise ist *MYCN* direkt an der Entwicklung dieser Resistenz beteiligt (Pajic et al., 2005).

Zudem könnte die Aktivierung antiapoptotischer Proteine durch GATA-4 in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen eine Rolle spielen. So ist gezeigt worden, dass *MYCN* selbst zwar Proliferation (Lutz et al., 1996), gleichzeitig aber auch Apoptose fördert; einige Chemotherapeutika wirkten *in vitro* stärker apoptotisch, wenn zugleich die Expression von *MYCN* induziert wurde (Paffhausen et al., 2007). Daher wird vermutet, dass für die maligne Transformation durch *MYCN* gleichzeitig antiapoptotische Signalwege induziert werden müssen (Goldsmith und Hogarty, 2005). Dies könnte über GATA-4 vermittelt werden. So wurden in Granulosazelltumoren des Ovars (Kyrönlähti et al., 2008) bzw. in ausdifferenzierten Kardiomyozyten (Aries et al., 2004) die antiapoptotischen Gene *Bcl-2* und *Bcl-X_L* als Zielgene von GATA-4 identifiziert. Beim Neuroblastom ist die Expression von *Bcl-2* (wie in der vorliegenden Arbeit für GATA-4 gezeigt) zudem mit einer ungünstigen Prognose und *MYCN*-Amplifikation assoziiert (Castle et al., 1993), und *Bcl-2* schützt Neuroblas-

tomzellen, die durch Induktion von *MYCN* unter Serumentzug zur Apoptose angeregt werden, vor dem Zelltod (Ushmorov et al., 2008). Ferner ist gezeigt worden, dass die Expression von Bcl-2 und Bcl-X_L in Neuroblastomzellen eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika vermitteln kann, eine Eigenschaft charakteristisch für Tumoren mit hohem Risiko (Dole et al., 1995; Dole et al., 1994; Hanada et al., 1993). Jedoch korrelieren die Expressionswerte für Bcl-2 und Bcl-X_L (Dole et al., 1995) nur teilweise mit den hier untersuchten Expressionswerten von GATA-4 in humanen Neuroblastom-Zelllinien. Es konnte aber nach GATA-4 Überexpression eine Erhöhung der Bcl-2 Expression ausgemacht werden (Abb. 3.19). Daher kommt *Bcl-2* als ein Zielgen von GATA-4 im Neuroblastom in Frage. Der ChIP-Assay deutet zudem darauf hin, dass, wie bereits in HEK293 Zellen gezeigt (Kobayashi et al., 2006), GATA-4 direkt an die *Bcl-2* 5'-UTR binden kann. Weder *Bcl-2* noch *Bcl-X_L* zeigten bei der Microarray-Analyse der GATA-4 überexprimierenden SH-SY5Y Zellen eine veränderte Expression; dies könnte auf die Auswertung mit stringenten Signifikanzwerten für Expressionsveränderungen zurückzuführen sein, wodurch vermutlich einige Zielgene nicht mit erfasst wurden.

Wie bereits beschrieben führte interessanterweise der *Knockdown* von GATA-3 mittels siRNA in der humanen Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 ebenfalls zu einer verminderten Proliferation (Molenaar et al., 2010). GATA-3 zeigt demnach *in vitro*, wie bereits in den Microarray-Analysen der primären Neuroblastome *in vivo* beobachtet, den umgekehrten Effekt zu GATA-4. Wie weiter unten diskutiert, besteht dieser Kontrast zwischen GATA-3 und -4 auch bei der Untersuchung Retinsäure-behandelter Neuroblastomzellen.

Keine der vier untersuchten Neuroblastom-Zelllinien zeigte eine veränderte Proliferation nach FOG-2 Überexpression. In MCF-7 und HepG2 Zellen wurde gezeigt, dass die Hemmung von FOG-2 durch miR-200 die Zellproliferation fördert (Hyun et al., 2009). Der *Knockdown* von FOG-2 wäre auch in Neuroblastomzellen ein wichtiger Ansatz, um eine mögliche Funktion von FOG-2 auszumachen. Bei der gemeinsamen Überexpression von GATA-4 und FOG-2 wurde der durch GATA-4 vermittelte Effekt leicht aufgehoben, war jedoch noch vorhanden (Abb. 3.15). Dies deutet darauf hin, dass FOG-2 allein oder als

Kofaktor von GATA-4 oder auch anderen Proteinen doch eine Funktion haben könnte. Welche Gene durch GATA-4 und FOG-2 zusammen verändert exprimiert werden und für diesen Effekt verantwortlich sein könnten, ist noch nicht geklärt. Dafür könnten Microarrays von FOG-2 und GATA-4 überexprimierenden Neuroblastomzellen hilfreich sein.

Morphologisch veränderten sich durch GATA-4 und/oder FOG-2 Überexpression lediglich SH-EP Zellen. Nach Überexpression von GATA-4 war deutlich eine Größenzunahme der SH-EP Zellen zu erkennen (Abb. 3.16). Dies kann nicht generell auf eine verlangsamte Proliferation zurückgeführt werden, da Retinsäure-behandelte SH-EP Zellen keine morphologische Veränderung zeigten, obwohl sie ebenfalls eine Proliferationsinhibition aufwiesen. Die Zunahme an Zellvolumen kann hingegen einen Zustand der Seneszenz charakterisieren, einhergehend mit einer verlangsamten Zellproliferation, wie bei einer humanen Zervixkarzinom-Zelllinie beobachtet (Goodwin et al., 2000). Auch bei Neuroblastomzellen ist der Zustand der Seneszenz nachgewiesen worden. SH-N und SH-F Zellen, beide Subklone der gleichen Parental-Zelllinie wie SH-SY5Y und SH-EP (SK-N-SH), reagierten unterschiedlich auf die Zugabe von Retinsäure. Während SH-N Zellen differenzierten, zeigten SH-F Zellen Anzeichen der Seneszenz einschließlich einer Größenzunahme der Zellen und verlangsamter Proliferation (Wainwright et al., 2001). Ob die GATA-4 überexprimierenden SH-EP Zellen tatsächlich einen seneszenten Zustand annehmen, müsste noch genauer überprüft werden. Interessanterweise kann es jedoch auch von der Expressionshöhe eines Onkogens abhängen, ob eine Zelle hyperproliferiert oder in Seneszenz geht (Collado und Serrano, 2010). Das legt nahe, dass die absolute Expressionshöhe von GATA-4 für den Effekt, der in der Zelle ausgelöst wird, entscheidend sein könnte.

4.5 *DPYSL3* als potentiell Zielgen von GATA-4 im Neuroblastom

DPYSL3 wurde als ein mögliches Zielgen von GATA-4 im Neuroblastom identifiziert (Abb. 3.17-3.18). *DPYSL3*, auch bekannt unter *Ulip* oder *CRMP-4*, gehört zu einer Fami-

lie von mindestens sechs intrazellulären Phosphoproteinen, die unterschiedliche Funktionen bei der neuronalen Differenzierung und dem Neuritenwachstum ausüben. Sie vermitteln intrazellulär Signale extrazellulärer Leitmoleküle und spielen somit eine Rolle bei der axonalen Wegfindung (Byk et al., 1998; Choi et al., 2005; Quinn et al., 1999). DPYSL3 wird während der Entwicklung nur in einem engen Zeitfenster während der neuronalen Differenzierung exprimiert. Nur differenzierende neuronale Zellen exprimieren DPYSL3; weder in neuronalen Vorläuferzellen noch in reifen, differenzierten Neuronen kann DPYSL3 detektiert werden (Choi et al., 2005; Quinn et al., 1999). Dies spiegelt sich auch in der Expression in neuroblastischen Tumoren wider. Nur die differenzierteren Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome exprimieren DPYSL3, nicht aber die undifferenzierten Neuroblastome, obwohl eine schwache Expression in Neuroblastom-Zelllinien nachgewiesen werden kann (Choi et al., 2005). DPYSL3 wird demnach beim differenzierenden Phänotyp eine wichtige Rolle zugeschrieben, die genaue Funktion im Tumor ist jedoch noch nicht bekannt. Die Stimulierung der Expression von *DPYSL3* durch GATA-4 in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y und SH-EP) könnte jedoch darauf hindeuten, dass GATA-4 einen differenzierenden Phänotyp in diesen Zellen induziert, auch wenn dies morphologisch noch nicht sichtbar ist. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass die Expression von DPYSL3 - genau wie GATA-4 - durch die Differenzierung von Neuroblastomzellen mit Retinsäure heraufreguliert wird (Choi et al., 2005; Gaetano et al., 1997). Weitere funktionelle Studien zu DPYSL3 im Neuroblastom sind notwendig, um die Bedeutung der Stimulierung der Expression von *DPYSL3* zu klären. Alternativ zu einer direkten Induktion der *DPYSL3* Expression durch GATA-4 könnte die Expression auch indirekt stimuliert werden.

4.6 Einfluss von Retinsäure auf GATA-Faktoren im Neuroblastom

Retinsäure wird aufgrund ihrer wachstumshemmenden und differenzierenden Eigenschaften bei der Therapie des Neuroblastoms eingesetzt (Reynolds et al., 2003). Sie fördert das Neuritenwachstum in Neuroblastomzellen über die direkte oder indirekte Induktion verschiedener Gene, u. a. der Transglutaminase, Neurofilament B und GAP-43 (Singh et al.,

2003), TrkB (Kaplan et al., 1993) und *neuron navigator* (NAV)2 (Muley et al., 2008). Der proliferationshemmende Effekt von Retinsäure wird ebenfalls über verschiedene Gene vermittelt, wobei die Reduktion von *ménage à trois* (MAT)1 (Zhang et al., 2004) und MYCN (und der damit verbundene verminderte Abbau von p27) (Nakamura et al., 2003) eine Rolle spielt. Jedoch reagieren nicht alle Neuroblastom-Zelllinien mit sowohl einer neuronalen Differenzierung als auch einer Proliferationshemmung. So zeigten in Übereinstimmung mit anderen Studien (Ciarapica et al., 2009; Pählman et al., 1984) SH-SY5Y Zellen sowohl verlängerte Neuriten als auch eine verminderte Proliferation, während SH-EP Zellen lediglich eine verminderte Proliferation aufwiesen (Abb. 3.20 A-B). Dass verschiedene Neuroblastom-Zelllinien unterschiedlich auf die Behandlung mit Retinsäure reagieren, ist grundsätzlich nicht überraschend, wie auch andere Analysen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigten (Sallmon et al., 2010). Die fehlende Differenzierung könnte in SH-EP Zellen u. a. auf die Induktion einer verkürzten Form von TrkB zurückzuführen sein (ohne die katalytische Tyrosinkinase-Domäne), wie für LAN-1-15N Zellen (humane Neuroblastom-Zelllinie) gezeigt wurde (Kaplan et al., 1993). Ein weiterer Grund könnte die differentielle Expression von Proteinen sein, welche an RAR oder RXR binden und so wiederum deren DNA-Bindung beeinflussen (Rana et al., 2002). Die zelltypspezifische Expression der RAR und RXR selbst spielt möglicherweise in einigen Zelllinien auch eine Rolle (Reynolds et al., 2003). Das unterschiedliche Ansprechen von SH-SY5Y und SH-EP Zellen auf die Behandlung mit Retinsäure ist auch deshalb interessant, da beide Zelllinien ursprünglich aus demselben Tumor stammen. Retinsäure kann bei der Therapie daher in unterschiedlichen Zellen desselben Tumors verschiedene Effekte ausüben.

Retinsäure führte in SH-SY5Y Zellen zu einer erhöhten Expression von GATA-4, während die GATA-4 Expression bei SH-EP Zellen unverändert blieb (Abb. 3.20 C). Das deutet zunächst darauf hin, dass dies mit dem unterschiedlichen Effekt auf die Differenzierung in beiden Zelllinien in Zusammenhang stehen könnte. Dabei könnte die Induktion von *DPYSL3* durch GATA-4 eine Rolle spielen. *DPYSL3* wird, wie bereits erwähnt, von differenzierenden neuronalen Zellen exprimiert (Choi et al., 2005). Ob *DPYSL3* an der Retinsäure-vermittelten Differenzierung in SH-SY5Y beteiligt ist, bleibt jedoch unklar, denn

durch die GATA-4 Überexpression allein (und die damit verbundene Erhöhung der *DPYSL3* Expression) konnte keine morphologisch sichtbare Differenzierung induziert werden (Abb. 3.16 und 3.18). *DPYSL3* wird in Retinsäure-behandelten SH-SY5Y und SMS-KCNR Zellen heraufreguliert, und dies vermutlich indirekt, d. h. nicht direkt über RAR oder RXR (Gaetano et al., 1997). GATA-4 könnte demnach an der Retinsäure-vermittelten Induktion von *DPYSL3* beteiligt sein. Das würde implizieren, dass *DPYSL3* in Retinsäure-behandelten SH-EP Zellen aufgrund der unverändert schwachen GATA-4 Expression nicht heraufreguliert wird.

Bereits bei der Klonierung des murinen Gata-4 ist gezeigt worden, dass Gata-4 Retinsäure-induzierbar ist. Hierbei wurden murine F9 embryonale Karzinomzellen mittels 0,2 μ M all-*trans* Retinsäure in viszerales Endoderm differenziert, was mit einem Anstieg an Gata-4 RNA und Protein einherging (Arceci et al., 1993). Daran ist vermutlich RAR γ beteiligt (Boylan et al., 1995). *GATA-4* wird zudem bei der normalen Herzentwicklung von Vögeln durch Retinoide heraufreguliert, wie Untersuchungen an Vitamin A-defizienten Wachtel-Embryonen zeigten (Kostetskii et al., 1999). Jedoch ist eine direkte Induktion über RAR oder RXR unwahrscheinlich, da bislang keine RAREs im GATA-4 Gen bekannt sind. Es wird vermutet, dass Gata-6 direkt über Retinsäure heraufreguliert wird und dies wiederum die Induktion von Gata-4 bewirkt. Das folgt aus Studien, in denen sowohl in murinen embryonalen Stammzellen (ES Zellen), die dem Wildtyp entsprechen, als auch in solchen, denen das Gen für Gata-4 fehlt, Gata-6 durch Retinsäure induziert wurde. Gata-4 wiederum wurde zwar in Wildtyp-Zellen durch Retinsäure induziert, nicht aber in Gata-6-defizienten ES Zellen (Capo-Chichi et al., 2005). In vorläufigen Experimenten von Aoyama et al. zeigte sich, dass in humanen Neuroblastomzellen GATA-4 und -6 häufig koexprimiert werden (Aoyama et al., 2005).

Werden Neuroblastomzellen mit Retinsäure behandelt, fördert dies jedoch auch den unerwünschten Effekt der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, wobei die Induktion des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins eine Rolle spielt (Hanada et al., 1993; Lasorella et al., 1995). Interessanterweise wird mit Bcl-2 ein weiteres Gen durch Retinsäure induziert (ne-

ben dem hier gezeigten GATA-4), das beim Neuroblastom primär mit einer ungünstigen Prognose assoziiert wird (Castle et al., 1993). Auch in SH-SY5Y Zellen wird durch Retinsäure-Behandlung Bcl-2 heraufreguliert, und die differenzierten Zellen sprechen auf verschiedene Chemotherapeutika praktisch nicht mehr an (Lasorella et al., 1995). Der Effekt ist jedoch nicht in allen Neuroblastom-Zelllinien zu beobachten, und in SH-EP Zellen ist er bislang nicht untersucht worden. Da GATA-4 in Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen heraufreguliert werden (Abb. 3.20) und Bcl-2 induzieren kann (Abb. 3.19), legt dies den Schluss nahe, dass GATA-4 möglicherweise an der u. a. durch Bcl-2 vermittelten Chemo-resistenz beteiligt ist. Es wäre interessant zu untersuchen, ob zumindest in manchen Zelllinien die Überexpression von GATA-4 allein für die Entwicklung einer Chemo-resistenz ausreicht.

Im Gegensatz zu GATA-4 (Heraufregulation) und *GATA-2* und *FOG-2* (kein Effekt) wurde die Expression von GATA-3 sowohl in SH-SY5Y als auch in SH-EP Zellen durch Retinsäure reprimiert (Abb. 3.20 D). Möglicherweise ist die Herunterregulation von GATA-3 an der proliferationshemmenden Wirkung von Retinsäure beteiligt, denn der *Knockdown* von GATA-3 führte in der humanen Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 zu einer verminderten Proliferation, einhergehend mit einer Abnahme an Cyclin D1 Protein (Molenaar et al., 2010). Ob dieser Zusammenhang auch in SH-SY5Y und SH-EP Zellen besteht, ist jedoch bislang nicht untersucht worden. Je nach Zelltyp wird die Expression von GATA-3 durch Zugabe von Retinsäure unterschiedlich reguliert. So führte die ATRA-Behandlung von murinen Thymozyten zu der bevorzugten Entwicklung von T_H2-Zellen und einer damit verbundenen Erhöhung der *Gata-3* Expression (Iwata et al., 2003). In humanen Endothelzellen hingegen blieb die *GATA-3* Expression auch nach Retinsäure-Behandlung unverändert niedrig (Dorfman et al., 1992). Daher kann kein genereller Mechanismus der Retinsäure-vermittelten veränderten GATA-3 Expression ausgemacht werden. Auffällig ist, dass GATA-3 und -4 stets eine gegensätzliche Expression und Funktion zeigten. So unterschieden sich zunächst deren Expressionsmuster im sich entwickelnden Nervensystem und in verschiedenen Subtypen des Neuroblastoms. Beide bewirkten zudem ein divergentes Proliferationsverhalten von Neuroblastomzellen. Während für GATA-3 der *Knockdown* mit

einer verminderten Proliferation in Zusammenhang gebracht wurde (Molenaar et al., 2010), galt dies für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen für die GATA-4 Überexpression. Schließlich wurde die Expression von GATA-3 nach Retinsäure-Behandlung der Neuroblastomzellen reprimiert und die Expression von GATA-4 induziert, zumindest in SH-SY5Y Zellen. Ob die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen die *in vivo* Effekte von GATA-3 und -4 bei der Pathogenese des Neuroblastoms widerspiegeln, ist nicht geklärt. Es wäre jedoch interessant zu untersuchen, ob sich der gegensätzliche Effekt von GATA-3 und -4 auch *in vivo* bestätigt.

Nicht nur bei der Expression und Funktion von GATA-3 und -4, auch grundsätzlich stellt sich bei den *in vitro* Experimenten mit Retinsäure die Frage, ob *in vivo* die gleichen Effekte erzielt würden. Dafür wäre es erforderlich, primäres Tumor-Gewebe nach Retinsäure-Behandlung zu analysieren, welches jedoch für diese Arbeit nicht zur Verfügung stand. Zusätzlich wäre es interessant, die Rolle der GATA-Transkriptionsfaktoren auch in differenzierteren neuroblastischen Tumoren (Ganglioneuroblastomen und Ganglioneuromen) zu untersuchen.

4.7 Schlussfolgerung

Das Neuroblastom stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar, da es sich klinisch und biologisch äußerst heterogen verhält. Während man bei jüngeren Patienten häufig eine spontane Remission beobachtet, haben ältere Patienten noch immer eine schlechtere Prognose. Möglicherweise spielt der Zeitpunkt, an dem die Zellen während der Entwicklung des sympathischen Nervensystems entarten, für die Prognose eine entscheidende Rolle (Nakagawara und Ohira, 2004). Mit der Untersuchung der Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3 und -4 sowie des Kofaktors FOG-2 konnte in dieser Arbeit die Hypothese bestätigt werden, dass wichtige Proteine der Entwicklung des sympathischen Nervensystems eher in günstigen Neuroblastomen höher exprimiert werden. Umgekehrt wurde ein weiterer Beleg dafür gefunden, dass in ungünstigen Neuroblastomen normale Entwicklungsprozesse ge-

stört sind. Interessanterweise führte GATA-4 *in vitro* zu einer Proliferationsinhibition von Neuroblastomzellen. Eine verlangsamte Proliferation der Tumorzellen muss sich jedoch nicht immer günstig auswirken, wie in anderen Tumoren bereits gezeigt wurde. Sollte dieser Effekt auch *in vivo* eine Rolle spielen, könnte GATA-4 an der schlechteren Therapierbarkeit von als ungünstig eingestuften Tumoren beteiligt sein. Zudem kann GATA-4 das antiapoptotische Protein Bcl-2 induzieren. Dies ist wiederum aufgrund der damit verbundenen Chemoresistenz für die Behandlung des Neuroblastoms von entscheidender Bedeutung. Das gilt insbesondere deshalb, weil in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass durch Retinsäure, ein in der Therapie eingesetztes Differenzierungsmittel, die Expression von GATA-4 induziert werden kann.

4.8 Ausblick

Zusammenfassend wird deutlich, dass GATA-4 für die Pathogenese des Neuroblastoms von entscheidender Bedeutung sein könnte. Daher sollte in weiterführenden Studien anhand von Neuroblastom-Mausmodellen die Funktion von GATA-4 *in vivo* untersucht werden, um die Relevanz der hier durchgeführten *in vitro* Experimente zu überprüfen. Zudem wäre Gewebe von Ganglioneuroblastomen und Ganglioneuromen als *in vivo* differenzierten neuroblastischen Tumoren sowie von Neuroblastomen nach Retinsäure-Behandlung hilfreich, um die Rolle von GATA-4 im Neuroblastom weiter aufzuklären. Zusätzlich sollte die Funktion von GATA-4 mittels *Knockdown* überprüft werden.

Um zu klären, welche Mechanismen im Tumor zu der differentiellen Expression von GATA-4 führen, stellt die Regulation von GATA-4 selbst einen weiteren interessanten Forschungsaspekt dar. Dabei sollte neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene auch die epigenetische Regulation in Betracht gezogen werden. Zudem könnte durch posttranslationale Modifikationen die Aktivität von GATA-4 beeinflusst sein.

5 Abkürzungsverzeichnis

α -MHC	<i>α-myosin heavy chain</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATRA	all- <i>trans</i> Retinsäure
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CIS	<i>carcinoma in situ</i>
d	Tag
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DPYSL3	<i>dihydropyrimidinase-like 3</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Entwicklungstag (während der Maus-Entwicklung)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ES Zellen	embryonale Stammzellen
FKS	Fetales Kälberserum
FOG	<i>friend-of-GATA</i>
GAP-43	<i>growth-associated protein-43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein

GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 β</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i>
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INRGSS	<i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
LOH	Verlust der Heterozygotie (<i>loss of heterozygosity</i>)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAT1	<i>ménage à trois 1</i>
MIBG	^{123}Jod -Metajodbenzylguanidin
miRNA	microRNA
MKI	Mitose-Karyorrhexis-Index
M-MLV RT	<i>Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
NAV2	<i>neuron navigator 2</i>
OD	optische Dichte
P	Postnataltag (während der Maus-Entwicklung)
PAM	<i>prediction analysis for microarrays</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

PNS	Peripheres Nervensystem
RAR	Retinsäure-Rezeptor (<i>retinoic acid receptor</i>)
RARE	<i>retinoic acid response element</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDHA	<i>succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
T _A	Annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNS	Trypsin-Neutralisationslösung
Trk	Tyrosinkinase-Rezeptor
UTR	untranslatierte Region
Wnt1	<i>wingless-type MMTV integration site 1</i>
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
XTT	Natrium 3'-[1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium]-bis-(4-Methoxy-6-Nitro)-Benzen-Sulfonsäurehydrat
ZNS	Zentrales Nervensystem

6 Literaturverzeichnis

- Adams, B. D.; Cowee, D. M. und White, B. A. (2009): The role of miR-206 in the epidermal growth factor (EGF) induced repression of estrogen receptor-alpha (ERalpha) signaling and a luminal phenotype in MCF-7 breast cancer cells, *Mol Endocrinol* 23 [8], Seite 1215-30.
- Agnihotri, S.; Wolf, A.; Picard, D.; Hawkins, C. und Guha, A. (2009): GATA4 is a regulator of astrocyte cell proliferation and apoptosis in the human and murine central nervous system, *Oncogene* 28 [34], Seite 3033-46.
- Akiyama, Y.; Watkins, N.; Suzuki, H.; Jair, K. W.; van Engeland, M.; Esteller, M.; Sakai, H.; Ren, C. Y.; Yuasa, Y.; Herman, J. G. und Baylin, S. B. (2003): GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer, *Mol Cell Biol* 23 [23], Seite 8429-39.
- Ambros, P. F.; Ambros, I. M.; Brodeur, G. M.; Haber, M.; Khan, J.; Nakagawara, A.; Schleiermacher, G.; Speleman, F.; Spitz, R.; London, W. B.; Cohn, S. L.; Pearson, A. D. und Maris, J. M. (2009): International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee, *Br J Cancer* 100 [9], Seite 1471-82.
- Anttonen, M.; Unkila-Kallio, L.; Leminen, A.; Butzow, R. und Heikinheimo, M. (2005): High GATA-4 expression associates with aggressive behavior, whereas low anti-Mullerian hormone expression associates with growth potential of ovarian granulosa cell tumors, *J Clin Endocrinol Metab* 90 [12], Seite 6529-35.
- Aoyama, M.; Ozaki, T.; Inuzuka, H.; Tomotsune, D.; Hirato, J.; Okamoto, Y.; Tokita, H.; Ohira, M. und Nakagawara, A. (2005): LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma, *Cancer Res* 65 [11], Seite 4587-97.
- Arceci, R. J.; King, A. A.; Simon, M. C.; Orkin, S. H. und Wilson, D. B. (1993): Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart, *Mol Cell Biol* 13 [4], Seite 2235-46.
- Aries, A.; Paradis, P.; Lefebvre, C.; Schwartz, R. J. und Nemer, M. (2004): Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [18], Seite 6975-80.
- Attiyeh, E. F.; London, W. B.; Mosse, Y. P.; Wang, Q.; Winter, C.; Khazi, D.; McGrady, P. W.; Seeger, R. C.; Look, A. T.; Shimada, H.; Brodeur, G. M.; Cohn, S. L.; Matthay, K. K. und Maris, J. M. (2005): Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma, *N Engl J Med* 353 [21], Seite 2243-53.
- Ayala, R. M.; Martinez-Lopez, J.; Albizua, E.; Diez, A. und Gilsanz, F. (2009): Clinical significance of Gata-1, Gata-2, EKLF, and c-MPL expression in acute myeloid leukemia, *Am J Hematol* 84 [2], Seite 79-86.

- Bai, Y.; Akiyama, Y.; Nagasaki, H.; Yagi, O. K.; Kikuchi, Y.; Saito, N.; Takeshita, K.; Iwai, T. und Yuasa, Y. (2000): Distinct expression of CDX2 and GATA4/5, development-related genes, in human gastric cancer cell lines, *Mol Carcinog* 28 [3], Seite 184-8.
- Bartel, D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116 [2], Seite 281-97.
- Biedler, J. L.; Helson, L. und Spengler, B. A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture, *Cancer Res* 33 [11], Seite 2643-52.
- Biewenga, J. E.; Destree, O. H. und Schrama, L. H. (1997): Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique, *J Neurosci Methods* 71 [1], Seite 67-75.
- Blumberg, B. (1997): An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural specification and neuronal differentiation, *Semin Cell Dev Biol* 8 [4], Seite 417-28.
- Boylan, J. F.; Lufkin, T.; Achkar, C. C.; Taneja, R.; Chambon, P. und Gudas, L. J. (1995): Targeted disruption of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism, *Mol Cell Biol* 15 [2], Seite 843-51.
- Brendel, V. und Karlin, S. (1989): Association of charge clusters with functional domains of cellular transcription factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [15], Seite 5698-702.
- Brodeur, G. M.; Maris, J. M.; Yamashiro, D. J.; Hogarty, M. D. und White, P. S. (1997): Biology and genetics of human neuroblastomas, *J Pediatr Hematol Oncol* 19 [2], Seite 93-101.
- Brodeur, G. M.; Pritchard, J.; Berthold, F.; Carlsen, N. L.; Castel, V.; Castelberry, R. P.; De Bernardi, B.; Evans, A. E.; Favrot, M.; Hedborg, F.; Kaneko, M.; Kemshead, J.; Lampert, F.; Lee, R. E. J.; Look, A. T.; Pearson, A. D. J.; Philip, T.; Roald, B.; Sawada, T.; Seeger, R. C.; Tsuchida, Y. und Voute, P. A. (1993): Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment, *J Clin Oncol* 11 [8], Seite 1466-77.
- Brodeur, G. M.; Seeger, R. C.; Schwab, M.; Varmus, H. E. und Bishop, J. M. (1984): Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage, *Science* 224 [4653], Seite 1121-4.
- Brodeur, G. M.; Sekhon, G. und Goldstein, M. N. (1977): Chromosomal aberrations in human neuroblastomas, *Cancer* 40 [5], Seite 2256-63.
- Byk, T.; Ozon, S. und Sobel, A. (1998): The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties, *Eur J Biochem* 254 [1], Seite 14-24.
- Cantor, A. B. und Orkin, S. H. (2005): Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins, *Semin Cell Dev Biol* 16 [1], Seite 117-28.
- Capo-Chichi, C. D.; Rula, M. E.; Smedberg, J. L.; Vanderveer, L.; Parmacek, M. S.; Morrisey, E. E.; Godwin, A. K. und Xu, X. X. (2005): Perception of differentiation cues

- by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells, *Dev Biol* 286 [2], Seite 574-86.
- Caron, H. (1995): Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma, *Med Pediatr Oncol* 24 [4], Seite 215-21.
- Caron, H.; van Sluis, P.; van Hoeve, M.; de Kraker, J.; Bras, J.; Slater, R.; Mannens, M.; Voute, P. A.; Westerveld, A. und Versteeg, R. (1993): Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification, *Nat Genet* 4 [2], Seite 187-90.
- Caslini, C.; Capo-chichi, C. D.; Roland, I. H.; Nicolas, E.; Yeung, A. T. und Xu, X. X. (2006): Histone modifications silence the GATA transcription factor genes in ovarian cancer, *Oncogene* 25 [39], Seite 5446-61.
- Castle, V. P.; Heidelberger, K. P.; Bromberg, J.; Ou, X.; Dole, M. und Nunez, G. (1993): Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification, *Am J Pathol* 143 [6], Seite 1543-50.
- Chang, A. N.; Cantor, A. B.; Fujiwara, Y.; Lodish, M. B.; Droho, S.; Crispino, J. D. und Orkin, S. H. (2002): GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [14], Seite 9237-42.
- Charron, F.; Tsimiklis, G.; Arcand, M.; Robitaille, L.; Liang, Q.; Molkenstein, J. D.; Melloche, S. und Nemer, M. (2001): Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA, *Genes Dev* 15 [20], Seite 2702-19.
- Chen, Q. R.; Song, Y. K.; Yu, L. R.; Wei, J. S.; Chung, J. Y.; Hewitt, S. M.; Veenstra, T. D. und Khan, J. (2010): Global genomic and proteomic analysis identifies biological pathways related to high-risk neuroblastoma, *J Proteome Res* 9 [1], Seite 373-82.
- Choi, Y. L.; Kim, C. J.; Matsuo, T.; Gaetano, C.; Falconi, R.; Suh, Y. L.; Kim, S. H.; Shin, Y. K.; Park, S. H.; Chi, J. G. und Thiele, C. J. (2005): HULip, a human homologue of unc-33-like phosphoprotein of *Caenorhabditis elegans*; Immunohistochemical localization in the developing human brain and patterns of expression in nervous system tumors, *J Neurooncol* 73 [1], Seite 19-27.
- Ciarapica, R.; Annibali, D.; Raimondi, L.; Savino, M.; Nasi, S. und Rota, R. (2009): Targeting Id protein interactions by an engineered HLH domain induces human neuroblastoma cell differentiation, *Oncogene* 28 [17], Seite 1881-91.
- Ciccarone, V.; Spengler, B. A.; Meyers, M. B.; Biedler, J. L. und Ross, R. A. (1989): Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages, *Cancer Res* 49 [1], Seite 219-25.
- Clagett-Dame, M.; McNeill, E. M. und Muley, P. D. (2006): Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation, *J Neurobiol* 66 [7], Seite 739-56.
- Cohen, N.; Betts, D. R.; Rechavi, G.; Amariglio, N. und Trakhtenbrot, L. (2003): Clonal expansion and not cell interconversion is the basis for the neuroblast and nonneu-

- ronal types of the SK-N-SH neuroblastoma cell line, *Cancer Genet Cytogenet* 143 [1], Seite 80-4.
- Cohn, S. L.; Pearson, A. D.; London, W. B.; Monclair, T.; Ambros, P. F.; Brodeur, G. M.; Faldut, A.; Hero, B.; Iehara, T.; Machin, D.; Mosseri, V.; Simon, T.; Garaventa, A.; Castel, V. und Matthay, K. K. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report, *J Clin Oncol* 27 [2], Seite 289-97.
- Collado, M. und Serrano, M. (2010): Senescence in tumours: evidence from mice and humans, *Nat Rev Cancer* 10 [1], Seite 51-7.
- Cushing, H. und Wolbach, S. B. (1927): The transformation of a malignant paravertebral sympathicoblastoma into a benign ganglioneuroma, *Am J Pathol* 3, Seite 203-16.
- D'Angio, G. J.; Evans, A. E. und Koop, C. E. (1971): Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis, *Lancet* 1 [7708], Seite 1046-9.
- Della Ragione, F.; Criniti, V.; Della Pietra, V.; Borriello, A.; Oliva, A.; Indaco, S.; Yamamoto, T. und Zappia, V. (2001): Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity, *FEBS Lett* 499 [3], Seite 199-204.
- Deol, M. S. (1967): The neural crest and the acoustic ganglion, *J Embryol Exp Morphol* 17 [3], Seite 533-41.
- Dole, M. G.; Jasty, R.; Cooper, M. J.; Thompson, C. B.; Nunez, G. und Castle, V. P. (1995): Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res* 55 [12], Seite 2576-82.
- Dole, M.; Nunez, G.; Merchant, A. K.; Maybaum, J.; Rode, C. K.; Bloch, C. A. und Castle, V. P. (1994): Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma, *Cancer Res* 54 [12], Seite 3253-9.
- Dorfman, D. M.; Wilson, D. B.; Bruns, G. A. und Orkin, S. H. (1992): Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells, *J Biol Chem* 267 [2], Seite 1279-85.
- El Wakil, A.; Francius, C.; Wolff, A.; Pleau-Varet, J. und Nardelli, J. (2006): The GATA2 transcription factor negatively regulates the proliferation of neuronal progenitors, *Development* 133 [11], Seite 2155-65.
- Engelsen, I. B.; Stefansson, I. M.; Akslen, L. A. und Salvesen, H. B. (2008): GATA3 expression in estrogen receptor alpha-negative endometrial carcinomas identifies aggressive tumors with high proliferation and poor patient survival, *Am J Obstet Gynecol* 199 [5], Seite 543 e1-7.
- Evans, T. und Felsenfeld, G. (1989): The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein, *Cell* 58 [5], Seite 877-85.
- Evans, T.; Reitman, M. und Felsenfeld, G. (1988): An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 [16], Seite 5976-80.

- Fischer, M.; Oberthuer, A.; Brors, B.; Kahlert, Y.; Skowron, M.; Voth, H.; Warnat, P.; Ernestus, K.; Hero, B. und Berthold, F. (2006): Differential expression of neuronal genes defines subtypes of disseminated neuroblastoma with favorable and unfavorable outcome, *Clin Cancer Res* 12 [17], Seite 5118-28.
- Fischer, M.; Oberthuer, A.; von Schweinitz, D. und Simon, T. (2005a): Das Neuroblastom, *Der Onkologe* 11 [10], Seite 1054-64.
- Fischer, M.; Skowron, M. und Berthold, F. (2005b): Reliable transcript quantification by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT1 and SDHA, *J Mol Diagn* 7 [1], Seite 89-96.
- Follenzi, A.; Ailles, L. E.; Bakovic, S.; Geuna, M. und Naldini, L. (2000): Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences, *Nat Genet* 25 [2], Seite 217-22.
- Fong, A. und Park, J. R. (2009): High-risk neuroblastoma: a therapy in evolution, *Pediatr Hematol Oncol* 26 [8], Seite 539-48.
- Fong, C. T.; Dracopoli, N. C.; White, P. S.; Merrill, P. T.; Griffith, R. C.; Housman, D. E. und Brodeur, G. M. (1989): Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [10], Seite 3753-7.
- Gaetano, C.; Matsuo, T. und Thiele, C. J. (1997): Identification and characterization of a retinoic acid-regulated human homologue of the unc-33-like phosphoprotein gene (hUlip) from neuroblastoma cells, *J Biol Chem* 272 [18], Seite 12195-201.
- Garson, J. A.; van den Berghe, J. A. und Kemshead, J. T. (1987): Novel non-isotopic in situ hybridization technique detects small (1 Kb) unique sequences in routinely G-banded human chromosomes: fine mapping of N-myc and beta-NGF genes, *Nucleic Acids Res* 15 [12], Seite 4761-70.
- George, K. M.; Leonard, M. W.; Roth, M. E.; Lieuw, K. H.; Kioussis, D.; Grosveld, F. und Engel, J. D. (1994): Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene, *Development* 120 [9], Seite 2673-86.
- Goldsmith, K. C. und Hogarty, M. D. (2005): Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma, *Cancer Lett* 228 [1-2], Seite 133-41.
- Goodwin, E. C.; Yang, E.; Lee, C. J.; Lee, H. W.; DiMaio, D. und Hwang, E. S. (2000): Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [20], Seite 10978-83.
- Grépin, C.; Nemer, G. und Nemer, M. (1997): Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor, *Development* 124 [12], Seite 2387-95.
- Gross, R. E.; Farber, S. und Martin, L. W. (1959): Neuroblastoma sympatheticum; a study and report of 217 cases, *Pediatrics* 23 [6], Seite 1179-91.

- Guo, M.; Akiyama, Y.; House, M. G.; Hooker, C. M.; Heath, E.; Gabrielson, E.; Yang, S. C.; Han, Y.; Baylin, S. B.; Herman, J. G. und Brock, M. V. (2004): Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer, *Clin Cancer Res* 10 [23], Seite 7917-24.
- Hanada, M.; Krajewski, S.; Tanaka, S.; Cazals-Hatem, D.; Spengler, B. A.; Ross, R. A.; Biedler, J. L. und Reed, J. C. (1993): Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells, *Cancer Res* 53 [20], Seite 4978-86.
- Hitoshi, S.; Seaberg, R. M.; Kosciuk, C.; Alexson, T.; Kusunoki, S.; Kanazawa, I.; Tsuji, S. und van der Kooy, D. (2004): Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling, *Genes Dev* 18 [15], Seite 1806-11.
- Holmes, M.; Turner, J.; Fox, A.; Chisholm, O.; Crossley, M. und Chong, B. (1999): hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation, *J Biol Chem* 274 [33], Seite 23491-8.
- Huang, W. Y.; Cukerman, E. und Liew, C. C. (1995): Identification of a GATA motif in the cardiac alpha-myosin heavy-chain-encoding gene and isolation of a human GATA-4 cDNA, *Gene* 155 [2], Seite 219-23.
- Huang, W. Y.; Heng, H. H. und Liew, C. C. (1996): Assignment of the human GATA4 gene to 8p23.1-->p22 using fluorescence in situ hybridization analysis, *Cytogenet Cell Genet* 72 [2-3], Seite 217-8.
- Hyun, S.; Lee, J. H.; Jin, H.; Nam, J.; Namkoong, B.; Lee, G.; Chung, J. und Kim, V. N. (2009): Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K, *Cell* 139 [6], Seite 1096-108.
- Ikeda, S.; He, A.; Kong, S. W.; Lu, J.; Bejar, R.; Bodyak, N.; Lee, K. H.; Ma, Q.; Kang, P. M.; Golub, T. R. und Pu, W. T. (2009): MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes, *Mol Cell Biol* 29 [8], Seite 2193-204.
- Iwata, M.; Eshima, Y. und Kagechika, H. (2003): Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors, *Int Immunol* 15 [8], Seite 1017-25.
- Jögi, A.; Ora, I.; Nilsson, H.; Lindeheim, A.; Makino, Y.; Poellinger, L.; Axelson, H. und Pahlman, S. (2002): Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [10], Seite 7021-6.
- Kaatsch, P. und Spix, C. (2008): Annual Report 2006/07 (1980-2006), German Childhood Cancer Registry, Mainz.
- Kaneko, M.; Yang, W.; Matsumoto, Y.; Watt, F. und Funa, K. (2006): Activity of a novel PDGF beta-receptor enhancer during the cell cycle and upon differentiation of neuroblastoma, *Exp Cell Res* 312 [11], Seite 2028-39.
- Kaplan, D. R.; Matsumoto, K.; Lucarelli, E. und Thiele, C. J. (1993): Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells., *Neuron* 11 [2], Seite 321-31.

- Karlsson, M.; Jungnelius, U.; Aamdal, S.; Boeryd, B.; Carstensen, J.; Kagedal, B.; Westberg, R. und Wingren, S. (1996): Correlation of DNA ploidy and S-phase fraction with chemotherapeutic response and survival in a randomized study of disseminated malignant melanoma, *Int J Cancer* 65 [1], Seite 1-5.
- Kaufmann, M. H. (2004): *The Atlas of Mouse Development*, Elsevier Academic Press, London (UK); San Diego (CA, USA).
- Kawamura, T.; Ono, K.; Morimoto, T.; Wada, H.; Hirai, M.; Hidaka, K.; Morisaki, T.; Heike, T.; Nakahata, T.; Kita, T. und Hasegawa, K. (2005): Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes, *J Biol Chem* 280 [20], Seite 19682-8.
- Kerbl, R.; Ambros, I. M.; Ambros, P. F.; Lackner, H.; Dornbusch, H. J. und Urban, C. E. (2002): Neuroblastoma with focal MYCN amplification and bone marrow infiltration: a staging and treatment dilemma, *Med Pediatr Oncol* 38 [2], Seite 109-11.
- Ketola, I.; Pentikainen, V.; Vaskivuo, T.; Ilvesmaki, V.; Herva, R.; Dunkel, L.; Tapanainen, J. S.; Toppari, J. und Heikinheimo, M. (2000): Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease, *J Clin Endocrinol Metab* 85 [10], Seite 3925-31.
- Kiiveri, S.; Siltanen, S.; Rahman, N.; Bielinska, M.; Lehto, V. P.; Huhtaniemi, I. T.; Muggia, L. J.; Wilson, D. B. und Heikinheimo, M. (1999): Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans, *Mol Med* 5 [7], Seite 490-501.
- Kitta, K.; Day, R. M.; Kim, Y.; Torregroza, I.; Evans, T. und Suzuki, Y. J. (2003): Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells, *J Biol Chem* 278 [7], Seite 4705-12.
- Kobayashi, S.; Lackey, T.; Huang, Y.; Bisping, E.; Pu, W. T.; Boxer, L. M. und Liang, Q. (2006): Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo, *FASEB J* 20 [6], Seite 800-2.
- Kohl, N. E.; Kanda, N.; Schreck, R. R.; Bruns, G.; Latt, S. A.; Gilbert, F. und Alt, F. W. (1983): Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas, *Cell* 35 [2 Pt 1], Seite 359-67.
- Komatsu, T.; Mizusaki, H.; Mukai, T.; Ogawa, H.; Baba, D.; Shirakawa, M.; Hatakeyama, S.; Nakayama, K. I.; Yamamoto, H.; Kikuchi, A. und Morohashi, K. (2004): Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9, *Mol Endocrinol* 18 [10], Seite 2451-62.
- Kostetskii, I.; Jiang, Y.; Kostetskaia, E.; Yuan, S.; Evans, T. und Zile, M. (1999): Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation, *Dev Biol* 206 [2], Seite 206-18.
- Kouros-Mehr, H.; Bechis, S. K.; Slorach, E. M.; Littlepage, L. E.; Egeblad, M.; Ewald, A. J.; Pai, S. Y.; Ho, I. C. und Werb, Z. (2008): GATA-3 links tumor differentiation

- and dissemination in a luminal breast cancer model, *Cancer Cell* 13 [2], Seite 141-52.
- Krejci, A.; Bruce, A. W.; Dolezal, V.; Tucek, S. und Buckley, N. J. (2004): Multiple promoters drive tissue-specific expression of the human M muscarinic acetylcholine receptor gene, *J Neurochem* 91 [1], Seite 88-98.
- Kuo, C. T.; Morrissey, E. E.; Anandappa, R.; Sigrist, K.; Lu, M. M.; Parmacek, M. S.; Sou-dais, C. und Leiden, J. M. (1997): GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation, *Genes Dev* 11 [8], Seite 1048-60.
- Kyrönlahti, A.; Rämö, M.; Tamminen, M.; Unkila-Kallio, L.; Butzow, R.; Leminen, A.; Nemer, M.; Rahman, N.; Huhtaniemi, I.; Heikinheimo, M. und Anttonen, M. (2008): GATA-4 regulates Bcl-2 expression in ovarian granulosa cell tumors, *Endocrinology* 149 [11], Seite 5635-42.
- Laitinen, M. P.; Anttonen, M.; Ketola, I.; Wilson, D. B.; Ritvos, O.; Butzow, R. und Heikinheimo, M. (2000): Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors, *J Clin Endocrinol Metab* 85 [9], Seite 3476-83.
- Lasorella, A.; Iavarone, A. und Israel, M. A. (1995): Differentiation of neuroblastoma enhances Bcl-2 expression and induces alterations of apoptosis and drug resistance, *Cancer Res* 55 [20], Seite 4711-6.
- Lassus, H.; Laitinen, M. P.; Anttonen, M.; Heikinheimo, M.; Aaltonen, L. A.; Ritvos, O. und Butzow, R. (2001): Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4, *Lab Invest* 81 [4], Seite 517-26.
- Lastowska, M.; Cotterill, S.; Pearson, A. D.; Roberts, P.; McGuckin, A.; Lewis, I. und Bown, N. (1997): Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group, *Eur J Cancer* 33 [10], Seite 1627-33.
- Laverriere, A. C.; MacNeill, C.; Mueller, C.; Poelmann, R. E.; Burch, J. B. und Evans, T. (1994): GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut, *J Biol Chem* 269 [37], Seite 23177-84.
- Lawson, M. A. und Mellon, P. L. (1998): Expression of GATA-4 in migrating gonadotropin-releasing neurons of the developing mouse, *Mol Cell Endocrinol* 140 [1-2], Seite 157-61.
- Liang, Q.; Wiese, R. J.; Bueno, O. F.; Dai, Y. S.; Markham, B. E. und Molkentin, J. D. (2001): The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes, *Mol Cell Biol* 21 [21], Seite 7460-9.
- Lim, K. C.; Lakshmanan, G.; Crawford, S. E.; Gu, Y.; Grosveld, F. und Engel, J. D. (2000): Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system, *Nat Genet* 25 [2], Seite 209-12.

- Lin, L.; Aggarwal, S.; Glover, T. W.; Orringer, M. B.; Hanash, S. und Beer, D. G. (2000): A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene, *Cancer Res* 60 [5], Seite 1341-7.
- Lizée, G.; Aerts, J. L.; Gonzales, M. I.; Chinnasamy, N.; Morgan, R. A. und Topalian, S. L. (2003): Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression, *Hum Gene Ther* 14 [6], Seite 497-507.
- London, W. B.; Castleberry, R. P.; Matthay, K. K.; Look, A. T.; Seeger, R. C.; Shimada, H.; Thorner, P.; Brodeur, G.; Maris, J. M.; Reynolds, C. P. und Cohn, S. L. (2005): Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group, *J Clin Oncol* 23 [27], Seite 6459-65.
- Loretz, W. (1870): Ein Fall von gangliösem Neurom (Gangliom), *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 49 [3], Seite 435-7.
- Lowry, J. A. und Atchley, W. R. (2000): Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain, *J Mol Evol* 50 [2], Seite 103-15.
- Lu, J. R.; McKinsey, T. A.; Xu, H.; Wang, D. Z.; Richardson, J. A. und Olson, E. N. (1999): FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors, *Mol Cell Biol* 19 [6], Seite 4495-502.
- Lutz, W.; Stohr, M.; Schurmann, J.; Wenzel, A.; Lohr, A. und Schwab, M. (1996): Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells, *Oncogene* 13 [4], Seite 803-12.
- Manuylov, N. L.; Smagulova, F. O. und Tevosian, S. G. (2007): Fog2 excision in mice leads to premature mammary gland involution and reduced Esr1 gene expression, *Oncogene* 26 [36], Seite 5204-13.
- Maris, J. M. und Matthay, K. K. (1999): Molecular biology of neuroblastoma, *J Clin Oncol* 17 [7], Seite 2264-79.
- Martin, D. I. und Orkin, S. H. (1990): Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1, *Genes Dev* 4 [11], Seite 1886-98.
- Matsuo, T.; Stauffer, J. K.; Walker, R. L.; Meltzer, P. und Thiele, C. J. (2000): Structure and promoter analysis of the human unc-33-like phosphoprotein gene. E-box required for maximal expression in neuroblastoma and myoblasts, *J Biol Chem* 275 [22], Seite 16560-8.
- Mazaud Guittot, S.; Bouchard, M. F.; Robert-Grenon, J. P.; Robert, C.; Goodyer, C. G.; Silversides, D. W. und Viger, R. S. (2009): Conserved usage of alternative 5' untranslated exons of the GATA4 gene, *PLoS One* 4 [12], Seite e8454.

- Mazaud Guittot, S.; Tetu, A.; Legault, E.; Pilon, N.; Silversides, D. W. und Viger, R. S. (2007): The proximal Gata4 promoter directs reporter gene expression to sertoli cells during mouse gonadal development, *Biol Reprod* 76 [1], Seite 85-95.
- Mehra, R.; Varambally, S.; Ding, L.; Shen, R.; Sabel, M. S.; Ghosh, D.; Chinnaiyan, A. M. und Kleer, C. G. (2005): Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis, *Cancer Res* 65 [24], Seite 11259-64.
- Merika, M. und Orkin, S. H. (1995): Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF, *Mol Cell Biol* 15 [5], Seite 2437-47.
- Mignotte, V.; Eleouet, J. F.; Raich, N. und Romeo, P. H. (1989a): Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [17], Seite 6548-52.
- Mignotte, V.; Wall, L.; deBoer, E.; Grosveld, F. und Romeo, P. H. (1989b): Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene, *Nucleic Acids Res* 17 [1], Seite 37-54.
- Minegishi, N.; Suzuki, N.; Kawatani, Y.; Shimizu, R. und Yamamoto, M. (2005): Rapid turnover of GATA-2 via ubiquitin-proteasome protein degradation pathway, *Genes Cells* 10 [7], Seite 693-704.
- Molenaar, J. J.; Ebus, M. E.; Koster, J.; Santo, E.; Geerts, D.; Versteeg, R. und Caron, H. N. (2010): Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells, *Oncogene*, E-published 15. Februar 2010.
- Molkentin, J. D. (2000): The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression, *J Biol Chem* 275 [50], Seite 38949-52.
- Molkentin, J. D.; Lin, Q.; Duncan, S. A. und Olson, E. N. (1997): Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis, *Genes Dev* 11 [8], Seite 1061-72.
- Monclair, T.; Brodeur, G. M.; Ambros, P. F.; Brisse, H. J.; Cecchetto, G.; Holmes, K.; Kaneko, M.; London, W. B.; Matthay, K. K.; Nuchtern, J. G.; von Schweinitz, D.; Simon, T.; Cohn, S. L. und Pearson, A. D. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report, *J Clin Oncol* 27 [2], Seite 298-303.
- Morimoto, T.; Hasegawa, K.; Kaburagi, S.; Kakita, T.; Wada, H.; Yanazume, T. und Sasayama, S. (2000): Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes, *J Biol Chem* 275 [18], Seite 13721-6.
- Morisco, C.; Seta, K.; Hardt, S. E.; Lee, Y.; Vatner, S. F. und Sadoshima, J. (2001): Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes, *J Biol Chem* 276 [30], Seite 28586-97.

- Morrissey, E. E.; Ip, H. S.; Lu, M. M. und Parmacek, M. S. (1996): GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm, *Dev Biol* 177 [1], Seite 309-22.
- Morrissey, E. E.; Ip, H. S.; Tang, Z. und Parmacek, M. S. (1997): GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily, *J Biol Chem* 272 [13], Seite 8515-24.
- Morrissey, E. E.; Tang, Z.; Sigrist, K.; Lu, M. M.; Jiang, F.; Ip, H. S. und Parmacek, M. S. (1998): GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo, *Genes Dev* 12 [22], Seite 3579-90.
- Mueller, S. und Matthay, K. K. (2009): Neuroblastoma: biology and staging, *Curr Oncol Rep* 11 [6], Seite 431-8.
- Muley, P. D.; McNeill, E. M.; Marzinke, M. A.; Knobel, K. M.; Barr, M. M. und Clagett-Dame, M. (2008): The atRA-responsive gene neuron navigator 2 functions in neurite outgrowth and axonal elongation, *Dev Neurobiol* 68 [13], Seite 1441-53.
- Nakagawara, A.; Arima-Nakagawara, M.; Scavarda, N. J.; Azar, C. G.; Cantor, A. B. und Brodeur, G. M. (1993): Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma, *N Engl J Med* 328 [12], Seite 847-54.
- Nakagawara, A.; Azar, C. G.; Scavarda, N. J. und Brodeur, G. M. (1994): Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas, *Mol Cell Biol* 14 [1], Seite 759-67.
- Nakagawara, A. und Ohira, M. (2004): Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model, *Cancer Lett* 204 [2], Seite 213-24.
- Nakamura, M.; Matsuo, T.; Stauffer, J.; Neckers, L. und Thiele, C. J. (2003): Retinoic acid decreases targeting of p27 for degradation via an N-myc-dependent decrease in p27 phosphorylation and an N-myc-independent decrease in Skp2, *Cell Death Differ* 10 [2], Seite 230-9.
- Nara, K.; Kusafuka, T.; Yoneda, A.; Oue, T.; Sangkhathat, S. und Fukuzawa, M. (2007): Silencing of MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification, *Int J Oncol* 30 [5], Seite 1189-96.
- Nardelli, J.; Thiesson, D.; Fujiwara, Y.; Tsai, F. Y. und Orkin, S. H. (1999): Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system, *Dev Biol* 210 [2], Seite 305-21.
- Negroni, A.; Scarpa, S.; Romeo, A.; Ferrari, S.; Modesti, A. und Raschella, G. (1991): Decrease of proliferation rate and induction of differentiation by a MYCN antisense DNA oligomer in a human neuroblastoma cell line, *Cell Growth Differ* 2 [10], Seite 511-8.
- Oberthuer, A.; Berthold, F.; Warnat, P.; Hero, B.; Kahlert, Y.; Spitz, R.; Ernestus, K.; Konig, R.; Haas, S.; Eils, R.; Schwab, M.; Brors, B.; Westermann, F. und Fischer, M.

- (2006): Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification, *J Clin Oncol* 24 [31], Seite 5070-8.
- Ohara, Y.; Atarashi, T.; Ishibashi, T.; Ohashi-Kobayashi, A. und Maeda, M. (2006): GATA-4 gene organization and analysis of its promoter, *Biol Pharm Bull* 29 [3], Seite 410-9.
- Ohira, M.; Morohashi, A.; Inuzuka, H.; Shishikura, T.; Kawamoto, T.; Kageyama, H.; Nakamura, Y.; Isogai, E.; Takayasu, H.; Sakiyama, S.; Suzuki, Y.; Sugano, S.; Goto, T.; Sato, S. und Nakagawara, A. (2003): Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets, *Oncogene* 22 [35], Seite 5525-36.
- Ohira, M.; Oba, S.; Nakamura, Y.; Isogai, E.; Kaneko, S.; Nakagawa, A.; Hirata, T.; Kubo, H.; Goto, T.; Yamada, S.; Yoshida, Y.; Fuchioka, M.; Ishii, S. und Nakagawara, A. (2005): Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate risk neuroblastomas, *Cancer Cell* 7 [4], Seite 337-50.
- Orkin, S. H. (1990): Globin gene regulation and switching: circa 1990, *Cell* 63 [4], Seite 665-72.
- Paffhausen, T.; Schwab, M. und Westermann, F. (2007): Targeted MYCN expression affects cytotoxic potential of chemotherapeutic drugs in neuroblastoma cells, *Cancer Lett* 250 [1], Seite 17-24.
- Påhlman, S.; Ruusala, A. I.; Abrahamsson, L.; Mattsson, M. E. und Esscher, T. (1984): Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation, *Cell Differ* 14 [2], Seite 135-44.
- Pajic, M.; Norris, M. D.; Cohn, S. L. und Haber, M. (2005): The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome, *Cancer Lett* 228 [1-2], Seite 241-6.
- Pandolfi, P. P.; Roth, M. E.; Karis, A.; Leonard, M. W.; Dzierzak, E.; Grosveld, F. G.; Engel, J. D. und Lindenbaum, M. H. (1995): Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis, *Nat Genet* 11 [1], Seite 40-4.
- Park, A. M.; Nagase, H.; Vinod Kumar, S. und Suzuki, Y. J. (2007): Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 [2], Seite H751-7.
- Piacentini, M.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Oliverio, S.; Piredda, L.; Biedler, J. L. und Melino, E. (1992): Phenotype-specific "tissue" transglutaminase regulation in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid: correlation with cell death by apoptosis, *Int J Cancer* 52 [2], Seite 271-8.

- Pilon, N.; Raiwet, D.; Viger, R. S. und Silversides, D. W. (2008): Novel pre- and post-gastrulation expression of Gata4 within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells, *Dev Dyn* 237 [4], Seite 1133-43.
- Quinn, C. C.; Gray, G. E. und Hockfield, S. (1999): A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth, *J Neurobiol* 41 [1], Seite 158-64.
- Rana, B.; Veal, G. J.; Pearson, A. D. und Redfern, C. P. (2002): Retinoid X receptors and retinoid response in neuroblastoma cells, *J Cell Biochem* 86 [1], Seite 67-78.
- Remvikos, Y.; Beuzeboc, P.; Zajdela, A.; Voillemot, N.; Magdelenat, H. und Pouillart, P. (1989): Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy, *J Natl Cancer Inst* 81 [18], Seite 1383-7.
- Rettig, W. J.; Spengler, B. A.; Chesa, P. G.; Old, L. J. und Biedler, J. L. (1987): Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants, *Cancer Res* 47 [5], Seite 1383-9.
- Reynolds, C. P.; Matthay, K. K.; Villablanca, J. G. und Maurer, B. J. (2003): Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma, *Cancer Lett* 197 [1-2], Seite 185-92.
- Rojas, A.; De Val, S.; Heidt, A. B.; Xu, S. M.; Bristow, J. und Black, B. L. (2005): Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element, *Development* 132 [15], Seite 3405-17.
- Rojas, A.; Kong, S. W.; Agarwal, P.; Gilliss, B.; Pu, W. T. und Black, B. L. (2008): GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and Cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium, *Mol Cell Biol* 28 [17], Seite 5420-31.
- Rojas, A.; Schachterle, W.; Xu, S. M. und Black, B. L. (2009): An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse Gata4 gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo, *Dev Dyn* 238 [10], Seite 2588-98.
- Romeo, P. H.; Prandini, M. H.; Joulin, V.; Mignotte, V.; Prenant, M.; Vainchenker, W.; Marguerie, G. und Uzan, G. (1990): Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors, *Nature* 344 [6265], Seite 447-9.
- Ross, R. A.; Spengler, B. A. und Biedler, J. L. (1983): Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells, *J Natl Cancer Inst* 71 [4], Seite 741-7.
- Sadée, W.; Yu, V. C.; Richards, M. L.; Preis, P. N.; Schwab, M. R.; Brodsky, F. M. und Biedler, J. L. (1987): Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line, *Cancer Res* 47 [19], Seite 5207-12.
- Sallmon, H.; Hoene, V.; Weber, S. C. und Dame, C. (2010): Differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells by all-trans retinoic acid activates the interleukin-18 system, *J Interferon Cytokine Res* 30 [2], Seite 55-8.

- Salonen, J.; Rajpert-De Meyts, E.; Mannisto, S.; Nielsen, J. E.; Graem, N.; Toppari, J. und Heikinheimo, M. (2010): Differential developmental expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6, their cofactor FOG-2 and downstream target genes in testicular carcinoma in situ and germ cell tumors, *Eur J Endocrinol* 162 [3], Seite 625-31.
- Savelyeva, L.; Corvi, R. und Schwab, M. (1994): Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells, *Am J Hum Genet* 55 [2], Seite 334-40.
- Scherzer, C. R.; Grass, J. A.; Liao, Z.; Pepivani, I.; Zheng, B.; Eklund, A. C.; Ney, P. A.; Ng, J.; McGoldrick, M.; Mollenhauer, B.; Bresnick, E. H. und Schlossmacher, M. G. (2008): GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene alpha-synuclein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [31], Seite 10907-12.
- Schulte, J. H.; Horn, S.; Schlierf, S.; Schramm, A.; Heukamp, L. C.; Christiansen, H.; Buettner, R.; Berwanger, B. und Eggert, A. (2009): MicroRNAs in the pathogenesis of neuroblastoma, *Cancer Lett* 274 [1], Seite 10-5.
- Schwab, M.; Alitalo, K.; Klempnauer, K. H.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M.; Gilbert, F.; Brodeur, G.; Goldstein, M. und Trent, J. (1983): Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour, *Nature* 305 [5931], Seite 245-8.
- Schwab, M.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M.; Grzeschik, K. H.; Naylor, S. L.; Sakaguchi, A. Y.; Brodeur, G. und Trent, J. (1984): Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc, *Nature* 308 [5956], Seite 288-91.
- Seeger, R. C.; Brodeur, G. M.; Sather, H.; Dalton, A.; Siegel, S. E.; Wong, K. Y. und Hammond, D. (1985): Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas, *N Engl J Med* 313 [18], Seite 1111-6.
- Sharma, A.; Masri, J.; Jo, O. D.; Bernath, A.; Martin, J.; Funk, A. und Gera, J. (2007): Protein kinase C regulates internal initiation of translation of the GATA-4 mRNA following vasopressin-induced hypertrophy of cardiac myocytes, *J Biol Chem* 282 [13], Seite 9505-16.
- Shibasaki, Y. (1994): High resolution mapping of the MYCN proto-oncogene at human chromosome 2p24.3 by fluorescence in situ hybridisation, *Cytogenet Cell Genet* 66 [1], Seite 75-6.
- Shimada, H.; Ambros, I. M.; Dehner, L. P.; Hata, J.; Joshi, V. V. und Roald, B. (1999a): Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee, *Cancer* 86 [2], Seite 349-63.
- Shimada, H.; Ambros, I. M.; Dehner, L. P.; Hata, J.; Joshi, V. V.; Roald, B.; Stram, D. O.; Gerbing, R. B.; Lukens, J. N.; Matthay, K. K. und Castleberry, R. P. (1999b): The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system), *Cancer* 86 [2], Seite 364-72.

- Shimamoto, T.; Ohyashiki, K.; Ohyashiki, J. H.; Kawakubo, K.; Fujimura, T.; Iwama, H.; Nakazawa, S. und Toyama, K. (1995): The expression pattern of erythrocyte/megakaryocyte-related transcription factors GATA-1 and the stem cell leukemia gene correlates with hematopoietic differentiation and is associated with outcome of acute myeloid leukemia, *Blood* 86 [8], Seite 3173-80.
- Sidell, N.; Altman, A.; Haussler, M. R. und Seeger, R. C. (1983): Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines, *Exp Cell Res* 148 [1], Seite 21-30.
- Siltanen, S.; Anttonen, M.; Heikkila, P.; Narita, N.; Laitinen, M.; Ritvos, O.; Wilson, D. B. und Heikinheimo, M. (1999): Transcription factor GATA-4 is expressed in pediatric yolk sac tumors, *Am J Pathol* 155 [6], Seite 1823-9.
- Singh, U. S.; Pan, J.; Kao, Y. L.; Joshi, S.; Young, K. L. und Baker, K. M. (2003): Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells, *J Biol Chem* 278 [1], Seite 391-9.
- Spitz, R.; Hero, B.; Skowron, M.; Ernestus, K. und Berthold, F. (2004): MYCN-status in neuroblastoma: characteristics of tumours showing amplification, gain, and non-amplification, *Eur J Cancer* 40 [18], Seite 2753-9.
- Spitzenberg, V.; König, C.; Ulm, S.; Marone, R.; Röpke, L.; Müller, J. P.; Grün, M.; Bauer, R.; Rubio, I.; Wymann, M. P.; Voigt, A. und Wetzker, R. (2010): Targeting PI3K in neuroblastoma, *J Cancer Res Clin Oncol*, E-published 12. März 2010.
- Stolze, I.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Freitag, P.; Wotzlaw, C.; Rossler, J.; Frede, S.; Acker, H. und Fandrey, J. (2002): Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells, *Blood* 100 [7], Seite 2623-8.
- Suenaga, Y.; Kaneko, Y.; Matsumoto, D.; Hossain, M. S.; Ozaki, T. und Nakagawara, A. (2009): Positive auto-regulation of MYCN in human neuroblastoma, *Biochem Biophys Res Commun* 390 [1], Seite 21-6.
- Svensson, E. C.; Tufts, R. L.; Polk, C. E. und Leiden, J. M. (1999): Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [3], Seite 956-61.
- Takaya, T.; Kawamura, T.; Morimoto, T.; Ono, K.; Kita, T.; Shimatsu, A. und Hasegawa, K. (2008): Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes, *J Biol Chem* 283 [15], Seite 9828-35.
- Tenhunen, O.; Sarman, B.; Kerkela, R.; Szokodi, I.; Papp, L.; Toth, M. und Ruskoaho, H. (2004): Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart, *J Biol Chem* 279 [23], Seite 24852-60.
- Tevosian, S. G.; Deconinck, A. E.; Cantor, A. B.; Rieff, H. I.; Fujiwara, Y.; Corfas, G. und Orkin, S. H. (1999): FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [3], Seite 950-5.

- Theissen, J.; Boensch, M.; Spitz, R.; Betts, D.; Stegmaier, S.; Christiansen, H.; Niggli, F.; Schilling, F.; Schwab, M.; Simon, T.; Westermann, F.; Berthold, F. und Hero, B. (2009): Heterogeneity of the MYCN oncogene in neuroblastoma, *Clin Cancer Res* 15 [6], Seite 2085-90.
- Thiele, C. J.; Reynolds, C. P. und Israel, M. A. (1985): Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma, *Nature* 313 [6001], Seite 404-6.
- Thurisch, B.; Liang, S. Y.; Sarioglu, N.; Schomburg, L.; Bungert, J. und Dame, C. (2009): Transgenic mice expressing small interfering RNA against Gata4 point to a crucial role of Gata4 in the heart and gonads, *J Mol Endocrinol* 43 [4], Seite 157-69.
- Tomita, Y.; Matsumura, K.; Wakamatsu, Y.; Matsuzaki, Y.; Shibuya, I.; Kawaguchi, H.; Ieda, M.; Kanakubo, S.; Shimazaki, T.; Ogawa, S.; Osumi, N.; Okano, H. und Fukuda, K. (2005): Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart, *J Cell Biol* 170 [7], Seite 1135-46.
- Tonini, G. P. (1993): Neuroblastoma: the result of multistep transformation?, *Stem Cells* 11 [4], Seite 276-82.
- Trainor, C. D.; Evans, T.; Felsenfeld, G. und Boguski, M. S. (1990): Structure and evolution of a human erythroid transcription factor, *Nature* 343 [6253], Seite 92-6.
- Tremblay, J. J.; Hamel, F. und Viger, R. S. (2002): Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity, *Endocrinology* 143 [10], Seite 3935-45.
- Tremblay, J. J. und Viger, R. S. (2003): Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells, *J Biol Chem* 278 [24], Seite 22128-35.
- Tsai, S. F.; Martin, D. I.; Zon, L. I.; D'Andrea, A. D.; Wong, G. G. und Orkin, S. H. (1989): Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells, *Nature* 339 [6224], Seite 446-51.
- Tsang, A. P.; Fujiwara, Y.; Hom, D. B. und Orkin, S. H. (1998): Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG, *Genes Dev* 12 [8], Seite 1176-88.
- Tsarovina, K.; Pattyn, A.; Stubbusch, J.; Muller, F.; van der Wees, J.; Schneider, C.; Brunet, J. F. und Rohrer, H. (2004): Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development, *Development* 131 [19], Seite 4775-86.
- Tumilowicz, J. J.; Nichols, W. W.; Cholon, J. J. und Greene, A. E. (1970): Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma, *Cancer Res* 30 [8], Seite 2110-8.
- Ulfing, N. (2005): *Kurzlehrbuch Embryologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Usary, J.; Llaca, V.; Karaca, G.; Presswala, S.; Karaca, M.; He, X.; Langerod, A.; Karsen, R.; Oh, D. S.; Dressler, L. G.; Lonning, P. E.; Strausberg, R. L.; Chanock, S.; Borre-

- sen-Dale, A. L. und Perou, C. M. (2004): Mutation of GATA3 in human breast tumors, *Oncogene* 23 [46], Seite 7669-78.
- Ushmorov, A.; Hogarty, M. D.; Liu, X.; Knauss, H.; Debatin, K. M. und Beltinger, C. (2008): N-myc augments death and attenuates protective effects of Bcl-2 in trophically stressed neuroblastoma cells, *Oncogene* 27 [24], Seite 3424-34.
- van Hamburg, J. P.; de Bruijn, M. J.; Dingjan, G. M.; Beverloo, H. B.; Diepstraten, H.; Ling, K. W. und Hendriks, R. W. (2008): Cooperation of Gata3, c-Myc and Notch in malignant transformation of double positive thymocytes, *Mol Immunol* 45 [11], Seite 3085-95.
- Van Roy, N.; Laureys, G.; Cheng, N. C.; Willem, P.; Opdenakker, G.; Versteeg, R. und Speleman, F. (1994): 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines, *Genes Chromosomes Cancer* 10 [2], Seite 103-14.
- Viger, R. S.; Guittot, S. M.; Anttonen, M.; Wilson, D. B. und Heikinheimo, M. (2008): Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease, *Mol Endocrinol* 22 [4], Seite 781-98.
- Voduc, D.; Cheang, M. und Nielsen, T. (2008): GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 [2], Seite 365-73.
- Wainwright, L. J.; Lasorella, A. und Iavarone, A. (2001): Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [16], Seite 9396-400.
- Wakamatsu, Y.; Watanabe, Y.; Nakamura, H. und Kondoh, H. (1997): Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: promotion of ventral migration and neuronal differentiation, *Development* 124 [10], Seite 1953-62.
- Wall, L.; deBoer, E. und Grosveld, F. (1988): The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein, *Genes Dev* 2 [9], Seite 1089-100.
- Wallach, I.; Zhang, J.; Hartmann, A.; van Landeghem, F. K.; Ivanova, A.; Klar, M. und Dame, C. (2009): Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells, *Pediatr Res* 65 [6], Seite 619-24.
- Wang, J.; Feng, X. H. und Schwartz, R. J. (2004): SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity, *J Biol Chem* 279 [47], Seite 49091-8.
- Wang, J.; Paradis, P.; Aries, A.; Komati, H.; Lefebvre, C.; Wang, H. und Nemer, M. (2005): Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4, *Mol Cell Biol* 25 [22], Seite 9829-44.
- Weiss, M. J. und Orkin, S. H. (1995): GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis, *Exp Hematol* 23 [2], Seite 99-107.

- Weiss, W. A.; Aldape, K.; Mohapatra, G.; Feuerstein, B. G. und Bishop, J. M. (1997): Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice, *EMBO J* 16 [11], Seite 2985-95.
- White, P. S.; Maris, J. M.; Beltinger, C.; Sulman, E.; Marshall, H. N.; Fujimori, M.; Kaufman, B. A.; Biegel, J. A.; Allen, C.; Hilliard, C.; Valentine, M. B.; Look, A. T.; Enomoto, H.; Sakiyama, S. und Brodeur, G. M. (1995b): A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [12], Seite 5520-4.
- White, R. A.; Dowler, L. L.; Pasztor, L. M.; Gatson, L. L.; Adkison, L. R.; Angeloni, S. V. und Wilson, D. B. (1995a): Assignment of the transcription factor GATA4 gene to human chromosome 8 and mouse chromosome 14: Gata4 is a candidate gene for Ds (disorganization), *Genomics* 27 [1], Seite 20-6.
- Wilson, D. B.; Dorfman, D. M. und Orkin, S. H. (1990): A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells, *Mol Cell Biol* 10 [9], Seite 4854-62.
- Wilzen, A.; Nilsson, S.; Sjoberg, R. M.; Kogner, P.; Martinsson, T. und Abel, F. (2009): The Phox2 pathway is differentially expressed in neuroblastoma tumors, but no mutations were found in the candidate tumor suppressor gene PHOX2A, *Int J Oncol* 34 [3], Seite 697-705.
- Yan, W.; Cao, Q. J.; Arenas, R. B.; Bentley, B. und Shao, R. (2010): GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition, *J Biol Chem* 285 [18], Seite 14042-51.
- Yanazume, T.; Hasegawa, K.; Morimoto, T.; Kawamura, T.; Wada, H.; Matsumori, A.; Kawase, Y.; Hirai, M. und Kita, T. (2003): Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure, *Mol Cell Biol* 23 [10], Seite 3593-606.
- Yang, H. Y. und Evans, T. (1992): Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains, *Mol Cell Biol* 12 [10], Seite 4562-70.
- Yang, X.; Zhou, Y.; Barcarse, E. A. und O'Gorman, S. (2008): Altered neuronal lineages in the facial ganglia of Hoxa2 mutant mice, *Dev Biol* 314 [1], Seite 171-88.
- Yang, Z.; Gu, L.; Romeo, P. H.; Bories, D.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. und Engel, J. D. (1994): Human GATA-3 trans-activation, DNA-binding, and nuclear localization activities are organized into distinct structural domains, *Mol Cell Biol* 14 [3], Seite 2201-12.
- Zhang, S.; He, Q.; Peng, H.; Tedeschi-Blok, N.; Triche, T. J. und Wu, L. (2004): MAT1-modulated cyclin-dependent kinase-activating kinase activity cross-regulates neuroblastoma cell G1 arrest and neurite outgrowth, *Cancer Res* 64 [9], Seite 2977-83.
- Zhou, B.; Ma, Q.; Kong, S. W.; Hu, Y.; Campbell, P. H.; McGowan, F. X.; Ackerman, K. G.; Wu, B.; Tevosian, S. G. und Pu, W. T. (2009): Fog2 is critical for cardiac function and maintenance of coronary vasculature in the adult mouse heart, *J Clin Invest* 119 [6], Seite 1462-76.

- Zhou, Y.; Yamamoto, M. und Engel, J. D. (2000): GATA2 is required for the generation of V2 interneurons, *Development* 127 [17], Seite 3829-38.
- Zon, L. I.; Gurish, M. F.; Stevens, R. L.; Mather, C.; Reynolds, D. S.; Austen, K. F. und Orkin, S. H. (1991): GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene, *J Biol Chem* 266 [34], Seite 22948-53.
- Zon, L. I.; Tsai, S. F.; Burgess, S.; Matsudaira, P.; Bruns, G. A. und Orkin, S. H. (1990): The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [2], Seite 668-72.
- Zufferey, R.; Donello, J. E.; Trono, D. und Hope, T. J. (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors, *J Virol* 73 [4], Seite 2886-92.
- Zufferey, R.; Nagy, D.; Mandel, R. J.; Naldini, L. und Trono, D. (1997): Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo, *Nat Biotechnol* 15 [9], Seite 871-5.

Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden in folgendem Originalartikel veröffentlicht:

Hoene, V.; Fischer, M.; Ivanova, A.; Wallach, T.; Berthold, F. und Dame, C. (2009): GATA factors in human neuroblastoma: distinctive expression patterns in clinical subtypes, Br J Cancer 101 [8], Seite 1481-9.

Weitere Originalartikel:

Sallmon, H.; **Hoene, V.**; Weber, S. C. und Dame, C. (2010): Differentiation of Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by All-Trans Retinoic Acid Activates the Interleukin-18 System, J Interferon Cytokine Res 30 [2], Seite 55-8.

Hoene, V.; Peiser, M. und Wanner, R. (2006): Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19, J Leukoc Biol 80 [6], Seite 1328-36.

Manuskript in Vorbereitung:

Hoene, V.; Becker, N. P.; Ehlen, A.; Harms, C.; Zhang, J.; Fischer, M. und Dame, C.: GATA-4, which is induced by retinoic acid in SH-SY5Y neuroblastoma cells, inhibits cellular proliferation and activates Bcl-2.

Buchbeitrag:

Hoene, V. und Dame, C. "Neuroblastoma: Role of GATA transcription factors" in der Serie "Tumors of the central nervous system" (5 Bände), Hrsg. M. A. Hayat, Springer-Verlag, eingeladener Übersichtsartikel in Fertigstellung, erwartete Publikation 2011

Kongressbeiträge:

Hoene, V.; Fischer, M.; Ivanova, A.; Berthold, F. und Dame, C. GATA-2 and -3 are highly expressed in neuroblastoma of favorable subtype. Posterpräsentation beim Brain Tumor Meeting, Berlin 2008

Hoene, V.; Fischer, M.; Ivanova, A.; Wallach, T.; Wallach, I.; Zhang, J.; Berthold, F. und Dame, C. GATA-4 im humanen Neuroblastom. Posterpräsentation bei der 104. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, München 2008 (Monatsschr Kinderheilkd, vol.156, Suppl.1, P-10-33-182)

Hoene, V.; Fischer, M.; Ivanova, A.; Wallach, T.; Wallach, I.; Zhang, J.; Berthold, F. und Dame, C. GATA-4 in human neuroblastoma cells. Posterpräsentation beim 6th FENS Forum of European Neuroscience, Genf 2008 (FENS Abstr., vol.4, 085.9)

Sallmon, H.; **Hoene, V.** und Dame, C. All-*trans*-Retinsäure reguliert das Interleukin-18 System in sich differenzierenden neuronalen Zellen. Posterpräsentation bei der 34. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Zürich 2008 (Z Geburtsh Neonatol 2008; 212: S70)

Hoene, V.; Pohl-Schickinger, A.; Ivanova, A. und Dame, C. GATA-4, ein Regulator von VEGF in neuronalen Zellen? Posterpräsentation bei der 34. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Zürich 2008 (Z Geburtsh Neonatol 2008; 212: S70-71)

Hoene, V.; Peiser, M. und Wanner, R. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the D-type CpG-oligonucleotide D19. Posterpräsentation beim 20th Annual Meeting of the European Macrophage & Dendritic Cell Society (EMDS), Freiburg 2006

Hoene, V.; Peiser, M. und Wanner, R. Human monocyte-derived dendritic cells express Toll-like receptor 9 and respond to CpG oligodeoxynucleotides. Posterpräsentation bei der 1. Spring School on Immunology der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Ettal 2005

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Christof Dame für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe für Molekulare Neonatologie an der Charité - Universitätsmedizin Berlin, die Möglichkeit der Bearbeitung dieses sehr interessanten Forschungsthemas, die hervorragende Betreuung und nicht zuletzt für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts. Weiterhin bedanke ich mich bei ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine stete Unterstützung und Förderung.

Bei Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel bedanke ich mich für die Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zu übernehmen.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Matthias Fischer und seiner Arbeitsgruppe an der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Kinderheilkunde der Universität zu Köln für die außerordentlich angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit sowie die Überlassung primärer Neuroblastom-Proben. Durch diese Kooperation ist meine Doktorarbeit entscheidend vorangekommen.

Bei JProf. Dr. Christoph Harms und seiner Arbeitsgruppe am Centrum für Schlaganfallforschung Berlin der Charité möchte ich mich sehr herzlich für die Hilfe und Unterstützung bei der Etablierung der lentiviralen Transduktionen sowie für die vielen fachlichen Gespräche und Anregungen bedanken.

Finanzielle Unterstützung leisteten ein Promotionsstipendium der Nachwuchskommission der Charité sowie die Fritz-Thyssen-Stiftung und die Berliner Krebsgesellschaft. Auch dafür mein herzlicher Dank.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei den studentischen Hilfskräften Anna Ehlen und Niels-Peter Becker. Sie haben durch ihre tatkräftige Unterstützung im letzten Jahr dieser Doktorarbeit und die vielen fachlichen und außerfachlichen Gespräche maßgeb-

lich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei Dr. Anna Ivanova möchte ich mich sehr herzlich für die Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen sowie ihre freundschaftliche Verbundenheit bedanken. Mein herzlicher Dank richtet sich auch an Boris Metze, der mir bei den statistischen Auswertungen in dieser Arbeit geholfen hat, sowie an Dr. Marco Sifringer für die Hilfestellung beim XTT-Assay und wertvolle Ratschläge.

Allen Mitgliedern der AG Molekulare Neonatologie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Für die Einarbeitung zu Beginn dieser Arbeit und die Freundschaft danke ich insbesondere Dr. Juan Zhang, Dr. Iwona Wallach, Dr. Boris Thurisch, Christiane Hussels, Julianne Langer, Dr. Sven Christian Weber und Thomas Wallach. Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Hannes Sallmon, der diese Arbeit Korrektur gelesen hat, für die äußerst nützlichen Anregungen, die vielen fachlichen Gespräche sowie seine Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Bei Dr. Matthias Peiser bedanke ich mich sehr herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit und seine hilfreichen Ratschläge.

Mein größter Dank gilt Steffen sowie meiner Familie für ihre Geduld und ihr Verständnis, insbesondere in der Schlussphase dieser Arbeit. Sie alle haben mich nicht nur während der Doktorarbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt und an mich geglaubt. Dafür bin ich sehr dankbar.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Victoria Sophie Hoene, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet und verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen verwendet habe. Zudem habe ich mich weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben noch besitze ich einen entsprechenden Doktorgrad. Die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin ist mir bekannt.

Berlin, Mai 2010